



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) 



ImmcoStripe™ ANA Advanced LIA

Line immunoassay (LIA) for the detection of anti-nuclear antibodies

IVD

PRODUCT INSERT

REF 6011 Anti-Nuclear (ANA-Advanced) Antibody LIA 20 Determinations

INTENDED USE

A line immunoassay for the detection and identification of antibodies to nuclear and cytoplasmic antigens associated with systemic and certain organ specific autoimmune diseases.

SUMMARY AND EXPLANATION

Laboratory methods to detect levels of antinuclear antibodies (ANA) in sera are commonly used to aid in the diagnosis of connective tissue disorders including systemic lupus erythematosus (SLE), mixed connective tissue disease (MCTD), Sjögren's syndrome and scleroderma.¹⁻⁵ ANA occur in about 95% of SLE patients as well as in patients with other connective tissue diseases. ANA may also occur in other disorders such as chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis.⁶⁻⁸

ANA are not disease specific; however, identification of particular ANA specificities may be used to support diagnosis of a particular disease or disease subset. ANA specificities can be determined by gel precipitation, hemagglutination, IFA, ELISA, western blot and other methods.

Antibodies to U-1 RNP are characteristic of MCTD patients. Antibodies to Sm antigen occur exclusively in SLE. SS-A (Ro) antibodies are detected in Sjögren's syndrome and SLE.¹ Antibodies to Jo-1 (histidyl-tRNA synthetase) occur in patients with myositis.^{1,3} SS-B (La) is primarily reported in SLE and Sjögren's syndrome. Antibodies to both the 52 kD SS-A (Ro) and the 48 kD SS-B (La) are found in virtually all patients with neonatal lupus erythematosus and complete heart block, and the presence of both in SLE indicates a later age of disease onset and a lower frequency of lupus nephritis.⁹ Scl-70 antibodies react with human topoisomerase and are found in patients with diffuse scleroderma. Antibodies to nucleosome remodeling and genome maintenance associated proteins such as Mi2 and Ku respectively are an indication of SLE. Autoantibodies against nuclear or cytoplasmic antigens directed against ribonucleoproteins involved in protein synthesis ("anti-synthetases") such as Jo1, PL-7, PL-12, EJ and OJ or translational transport (SRP54) are detectable in about a fifth of polymyositis (PM) / dermatomyositis (DM) patients. The ANA Advanced LIA panel is able to detect antibodies to most of the above described antigens as well as AMA-M2, a major target of anti-mitochondrial autoantibodies, a characteristic feature of PBC (primary biliary cirrhosis). Anti-DFS70 antibodies have been associated with normal population. The ImmcoStripe™ ANA-Advanced LIA panel is capable of simplifying the detection of auto-antibodies against 22 key antigens that may also be observed by IFA screening on HEP-2 cell substrates. Following antigens are immobilized on the test strips: PM-Scl100, PM-Scl75, SSA/Ro52, SSA/Ro60, Jo1, Ribo-P, Nucleosomes, DNA, Histones, Sm, U1SnRNP68, U1SnRNP A, U1SnRNP C, SSB/La, Scl70, CENP-B, PCNA, Mi2, Ku, SRP54, AMA-M2 and DFS70 (LEDGF). In addition to the antigen lines, a cut-off, serum and conjugate control line is provided in the bottom of the strip.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

To perform the test, strips are incubated with diluted patient serum. In positive sera antibodies specifically bind to one or more of the test lines on the strip. The strips are washed according to the protocol, and then the pre-diluted, ready-to-use conjugate is added to the test strips. After incubation and wash steps, the ready-to-use substrate is added to the strips. During a 10 minute incubation, conjugate and substrate binding produces visible blue/purple lines for serum, conjugate and cut-off control lines. If the sample is positive for any of the antigen coated test lines, it will show a reaction more intense than the cut-off line. Reactions are read visually and reported as positive, negative or equivocal (comparable to cut-off line).

EN

Materials Provided

ANA Advanced LIA **REF** 6011

Kits contain sufficient reagents to perform 20 determinations.

20 x **STRIP**ANA Adv**LIA**

1 x 120 µl **CONTROL**+**ANA**

1 x 30 ml **CONJ**LIA

1 x 30 ml **SUBSTRATE**

1 x 40 ml **SAMPLE**DIL

1 x 50 ml **BUF**WASH**LIA**

2 x

1 x

Line Immunoassay Test Strips, containing antinuclear antigen coated test lines and control lines. Ready for use.

Positive Control (red cap). Contains human serum positive for ANA.

IgG Conjugate.

Enzyme Substrate (amber bottle). Ready for use. **Protect from light**.

Sample Diluent

Wash Buffer Concentrate. **Reconstitute to one liter** with deionized or distilled water or as needed proportionally.

LIA 10 well Assay Trays

Report/Scoring Sheet

Symbols used on labels



Lot number



Catalog number



In vitro diagnostic use



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use



Number of tests



Manufacturer



Date of Manufacture

Materials Required But Not Provided

- Clean 1000 ml graduated cylinder
- Non-serrated forceps (Filter forceps)
- Rocker or rotating platform shaker
- Absorbent paper or paper towels
- Deionized or distilled water
- Squeeze bottles to hold diluted wash buffer or distilled water
- Pipettes capable of delivering 10 to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Timer

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C; **do not freeze**.

All reagents must be brought to room temperature (18-25°C) and mixed thoroughly prior to use. Do not use if reagent is not clear or if insoluble precipitate is present. The reagents are stable until the indicated expiration date when stored at 2-8°C and protected from contamination, or as stated below after opening and/or reconstitution.

- Antigen coated test strips **STRIP**ANA Adv**LIA** are ready for use. Please allow the test strip bag to reach the room temperature before opening to avoid condensation and associated deterioration. Please re-pack unused test strips and store at 2-8°C in dark and dry conditions.
- Sample Diluent **SAMPLE**DIL is ready to use. After opening, Sample Diluent **SAMPLE**DIL is stable for at least 8 weeks when stored properly and protected from microbial or chemical contamination.

EN

- Reconstitute 1 part [BUF|WASH|LIA] into 19 parts of distilled or deionized water to produce 1 liter of Wash Buffer. Wash Buffer is stable for at least 8 weeks after reconstitution when stored properly and protected from microbial contamination.
- [CONJ|LIA] and [SUBSTRATE] are stable for at least 8 weeks after opening when stored properly and protected from microbial contamination. [SUBSTRATE] is light sensitive and must be stored in the provided amber colored bottle.

Antigen strips can only be used once. Do not interchange components of different lots. Do not use reagents beyond expiration date indicated on labels.

Precautions

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

WARNING – Proclin 300 is a preservative. Upon disposal of liquids containing Proclin 300, flush with large volumes of water to dilute the components below active levels.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Specimens with gross hemolysis, elevated lipids or microbial contamination may interfere with the performance of the test and therefore must not be used. Store specimens at 2°-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. It is recommended that frozen specimens be tested within one year. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Procedural Notes

- Read Product Insert carefully before starting with the assay.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate to room temperature for approximately 30 minutes prior to starting the test procedure. Return all unused specimens and reagents to the refrigerator promptly after use.
- Proper washing technique is critical to the satisfactory performance of the assay.
- Handle test strips with clean forceps or gloves only. Avoid touching the white antigen coated areas.
- The test lines are placed above the cut-off, serum and conjugate control lines as described in the schematic (Figure 1). Serum and conjugate control lines appear on the same piece of nitrocellulose at the bottom of the strip.
- Assign specimen identification numbers to the respective strips on the Report Form. Each strip has the strip number and lot number printed on the bottom for traceability.
- Complete all other relevant information on the Report Form prior to starting the assay.

Test Method

- Step 1** Using gloves or blunt forceps, peel off the required number of strips. Care should be taken not to touch the antigen coated areas with bare hands or pointed forceps.
- Step 2** Place required number of [STRIP|ANA Adv|LIA] labeled side up into individual wells of the assay tray.
- Step 3** Pipet 1.5 ml of [SAMPLE|DIL] into each well; make sure that the strips are completely submerged under the liquid.
- Step 4** Incubate the strips in [SAMPLE|DIL] for at least 10 minutes on a rocker. The blue color in coated antigen and control locations starts to disappear as the membrane is soaked.
- Step 5** Pipet 15 µl of serum or positive control sample into the appropriate wells to obtain a 1:101 dilution. Incubate 60 minutes (±5 min.) at room temperature on a rocker or rotating shaker.

Step 6 WASH: Aspirate sample solution into waste container. Thoroughly wash strips with the **reconstituted** Wash Buffer by squirting approximately 2ml of solution directly onto strips. Wash strips with gentle agitation for 5 minutes and aspirate solution into waste container. Repeat the wash two more times.

Caution: Complete washing of the strips between incubations is crucial to obtain valid results. Improper washing will result in high background staining. Do not allow the strips to become dry at any step during the assay.

Step 7 Pipet 1.0 ml of **CONJ|LIA** into each well. Incubate 30 minutes (± 5 min) at room temperature on rocker or rotating shaker.

Step 8 Repeat Step 6.

Step 9 Pipet 1.0 ml **SUBSTRATE|TMB** into each well and incubate with gentle shaking 10 minutes at room temperature in reduced light. The serum and conjugate control lines develop intense color after incubation in substrate. The cut-off control line develops into a blank to faintly colored line after the incubation.

Step 10 To stop the reaction, rinse strips 2x with distilled/deionized water by squirting approximately 2ml of water directly onto strips followed by aspiration. Do not soak/wash for more than 10 minutes as this may result in decreased sensitivity of the developed colored lines.

Step 11 Using blunt forceps remove strips from assay tray and place them gently onto absorbent paper and allow them to dry. Let the strips dry before analysis or affixing them on the report/scoring sheet.

Quality Control

Procedural Controls: Each strip has three procedural controls for the addition of serum and conjugate and a cut-off line for determining the weak or negative reactions.

Positive and Negative controls are available as optional components and may be run for additional quality control.

Individual labs are expected to optimize the substrate development time by ± 4 minutes based on the blot processor or manual methodology. It is recommended that the cut-off line should be faintly visible to the eye, post incubation with substrate.

Interpretation

The test strips contain control lines at the bottom and test line above the controls. The bottom end of the test strip (near serial number) has three control lines: the cut-off line, the serum control line and the conjugate control line from top to bottom. The cut-off allows the technician to determine the test result as positive, negative or indeterminate (+/-). The two procedure control lines ensure the addition of specimen, conjugate and substrate.

Compare the reaction of the test lines with those of the controls. Use of a magnifying glass can assist in observation of weak reactions.

- As labeled in Figure 1, the serum and conjugate control lines should be clearly positive indicating a successful experiment. The cut-off is a faint line with variation in intensity based on the experimental conditions. The schematic in Figure 1 shows an example test line. In the ANA Advanced LIA (Figure 2) there are 22 test lines and 3 control lines. The test line development depends on the sample. Positive reactions can occur in varying intensities from weak to strong. **Weak reactions should be compared with intensity of the provided cut-off line within the strip.** Reactions that are distinctly darker or denser than the intensity of the cut-off line should be considered positive.
- Strips may show a homogeneous or discolored background due to various interfering factors in lipemic or hemolytic sera. This effect can also be seen if the test strips are not sufficiently blocked or accidentally allowed to dry up during the assay.
- In case of weak positive and negative reactions, the reacted line intensity should be compared to cut-off line to determine the result as negative (weaker intensity than the cut-off line) or equivocal (+/-; indistinguishable from cut-off line). Visualization of weak reactions is improved when the strips are completely dry. Equivocal samples should be confirmed by an alternate method.

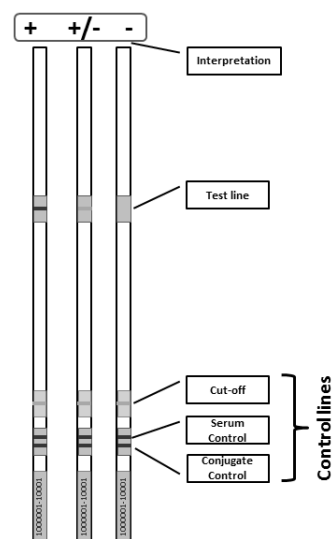


Figure 1: Schematic of reacted LIA strips with one test line.

EN

- Dried strips can be assembled in the provided report/scoring sheet. The plastic protective flap is permanently affixed to the report sheet on the left edge. Carefully peel the plastic flap in the right to left direction like a page of the book. Place the reacted strips on the adhesive tape in the respective slot and cover the plastic flap back in place. The protective plastic flap is designed to be reusable for multiple sessions of experiments and the strips can be assembled in respective slots. The technician can use the form to record the lot numbers of used reagents, specimen number and results/comments.

Figure 2: Schematic of Report Sheet

LIMITATIONS OF PROCEDURE

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Do not store specimen at 2-8°C more than a week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

The ANA Advanced LIA should only be used as an aid to diagnosis. Positive results may be found in other autoimmune conditions or certain infectious diseases. Hence, results should be evaluated and interpreted by a medical authority in light of the patient's clinical history and other laboratory findings.

EXPECTED VALUES

At 1:40 titer, elevated levels of anti-nuclear and cytoplasmic antibodies may be present in up to 30% individuals in a "normal" population as determined by IFA methodology. At a titer of 1:320 positivity rate in normal population has been reported to drop to approximately 3%. Incidence of autoantibody positivity varies to a great extent based on the specific antigens, studies and selected cohort of specimens. The expected values in a normal population are negative on LIA. LIA panels are designed to provide optimal sensitivity and specificity. It is recommended to confirm the positive result by an alternate methodology.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Antigen Specificities

The ANA Advanced LIA is able to detect autoantibodies to the following antigens: PM-Scl100, PM-Scl75, Ro-52, Ro-60, Jo-1, Ribo-P, Nucleosomes, DNA, Histones, Sm, U1RNP68, U1RNP A, U1RNP C, SS-B/La, Scl-70, Cenp-B, PCNA, Mi-2, Ku, SRP-54 and AMA-M2 and DFS70 (LEDGF). Refer to Figure 2 for individual antigen and control line positions.

Cross-reactivity

A panel of potentially cross-reactive autoimmune disease sera from conditions not associated with ANA was tested using the ANA-Advanced LIA test. 1 out of 550 determinations demonstrated a positive reaction indicating a specificity of 99.8% in this population.

Interference

Interference was studied by mixing sera with known levels of autoantibodies for each analyte with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. No significant interference was demonstrated for the following substances at the levels indicated: Hemoglobin (5 mg/ml), Bilirubin (0.4 mg/ml), Rheumatoid Factor (200 EU equivalent) and Triglycerides (25 mg/ml). Interference studies have been done according to the CLSI guidelines (publication EP7-A2).

Reproducibility

Assays of samples in the negative range, equivocal and positive range were performed to determine qualitative reproducibility from run to run and operator to operator. Results produced 100% qualitative agreement.

ImmcoStripe™ ANA Advanced LIA

Ανοσοδοκιμασία Γραμμής (LIA) για την ανίχνευση αντι-πυρηνικών αντισωμάτων

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF

6011

Ανοσοδοκιμασία Γραμμής (LIA) για

20 Προσδιορισμοί

Αντι-Πυρηνικά (ANA-Advanced) Αντισώματα

ΣΚΟΠΟΥΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Ανοσοδοκιμασία γραμμής για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό αντισωμάτων σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά αντιγόνα που σχετίζονται με συστηματικές και ορισμένες αυτοάνοσες νόσους συγκεκριμένων οργάνων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Εργαστηριακές μέθοδοι για την ανίχνευση των επιπέδων των αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) σε ορούς χρησιμοποιούνται συχνά για να συμβάλλουν στη διάγνωση διαταραχών του συνδετικού ιστού στις οποίες περιλαμβάνονται ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ), η μικτή νόσος του συνδετικού ιστού (MCTD), το σύνδρομο Sjögren και η σκληροδερμία.¹⁻⁵ Τα αντισώματα ANA εμφανίζονται περίπου στο 95% των ασθενών με ΣΕΛ, καθώς επίσης και σε ασθενείς με άλλες νόσους του συνδετικού ιστού. ANA ενδέχεται επίσης να εμφανιστούν και σε άλλες διαταραχές, όπως η χρόνια ενεργός ηπατίτιδα και η πρωτοπαθής χολική κίρρωση.⁶⁻⁸

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) δεν είναι συγκεκριμένα για κάποια νόσο ωστόσο, ο προσδιορισμός συγκεκριμένων ειδικοτήτων των ANA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υποστηρίξει τη διάγνωση μιας συγκεκριμένης νόσου ή υποσυνόλου νόσου. Οι ειδικότητες των ANA μπορούν να προσδιοριστούν μέσω καταβύθισης γέλης, αιμοσυγκόλλησης, Έμμεσου Ανοσοφθορισμού (IFA), ELISA, ανοσοαποτυπώματος μεθόδου western blot και με άλλες μεθόδους.

Τα αντισώματα στο U-1 RNP είναι χαρακτηριστικά σε ασθενείς με μικτή νόσο του συνδετικού ιστού (MCTD). Τα αντισώματα στο αντιγόνο Sm εμφανίζονται αποκλειστικά σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ). Τα αντισώματα SS-A (Ro) ανιχνεύονται σε σύνδρομο Sjögren και σε ΣΕΛ.¹ Τα αντισώματα στο αυτοαντιγόνο Jo-1 (ιστιδύλ-tRNA συνθετάση) εμφανίζονται σε ασθενείς με μυοσίτιδα.^{1,3} Τα SS-B (La) αναφέρονται κατά κύριο λόγο σε ΣΕΛ και σε σύνδρομο Sjögren. Τα αντισώματα τόσο σε 52 kD SS-A (Ro) και σε 48 kD SS-B (La) συναντώνται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς με νεογνικό ερυθηματώδη λύκο και ολικό καρδιακό αποκλεισμό, και η παρουσία και των δύο σε ΣΕΛ υποδεικνύει μεγαλύτερη ηλικία αρχικής εμφάνισης της νόσου και χαμηλότερη συχνότητα νεφρίτιδας του λύκου.⁹ Τα αντισώματα Scl-70 αντιδρούν με την ανθρώπινη τοποϊσομεράση και συναντώνται σε ασθενείς με διάχυτη σκληροδερμία. Τα αντισώματα σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση νουκλεοσωμάτων και τη διατήρηση του γονιδιώματος, όπως η Mi2 και η Ku αντίστοιχα, αποτελούν ένδειξη ΣΕΛ. Αυτοαντισώματα κατά πυρηνικών ή κυτταροπλασματικών αντιγόνων που κατευθύνονται κατά ριβονουκλεοπρωτεϊνών που σχετίζονται με τη σύνθεση πρωτεϊνών («αντι-συνθετάσες») όπως Jo1, PL-7, PL-12, EJ και OJ ή τη μεταφραστική μεταφορά (SRP54) είναι ανιχνεύσιμα σε περίπου ένα πέμπτο των ασθενών με πολυμυοσίτιδα (PM) / δερματομυοσίτιδα (DM). Ο πίνακας Ανοσοδοκιμασίας Γραμμής (LIA) ANA Advanced μπορεί να ανιχνεύσει αντισώματα κατά των περισσότερων αντιγόνων που αναφέρονται παραπάνω, καθώς και AMA-M2, ένα σημαντικό στόχο των αντι-μιτοχονδριακών αυτοαντισωμάτων, χαρακτηριστικό στοιχείο της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης (PBC). Τα αντισώματα αντί-DFS70 έχουν συσχετιστεί με φυσιολογικό πληθυσμό. Το ImmcoStripe™ ANA-Advanced LIA panel είναι ικανό να απλοποιήσει την ανίχνευση αυτο-αντισωμάτων κατά 22 αντιγόνων-κλειδιά που ενδέχεται επίσης να παρατηρηθούν με μέθοδο ανάλυσης Έμμεσου Ανοσοφθορισμού (IFA) σε υποστρώματα κυτάρων HEp-2. Τα ακόλουθα αντιγόνα ακινητοποιούνται πάνω στις ταινίες ανάλυσης: PM-Scl100, PM-Scl75, SSA/Ro52, SSA/Ro60, Jo1, Ribo-P, Πυρηνοσώματα, DNA, Ιστονικά, Sm, U1SnRNP68, U1SnRNP A, U1SnRNP C, SSB/La, Scl70, CENP-B, PCNA, Mi2, Ku, SRP54, AMA-M2 και DFS70 (LEDGF). Πέραν των γραμμών των αντιγόνων, μια γραμμή ελέγχου αποκοπής (cut-off), ορού και συζεύγματος παρέχεται στο κάτω μέρος της ταινίας.

ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Για να πραγματοποιήσετε την ανάλυση, οι ταινίες επωάζονται με αραιωμένο ορό ασθενών. Σε θετικούς ορούς, τα αντισώματα δεσμεύονται συγκεκριμένα σε μία ή περισσότερες από τις γραμμές ανάλυσης πάνω στην ταινία. Οι ταινίες πλένονται σύμφωνα με το πρωτόκολλο, και στη συνέχεια το προ-αραιωμένο, έτοιμο προς χρήση σύζευγμα προστίθεται στις ταινίες ανάλυσης. Μετά την επώαση και τα βήματα έκπλυσης, το έτοιμο προς χρήση υπόστρωμα προστίθεται στις ταινίες. Κατά τη διάρκεια 10-λεπτης επώασης, η δέσμευση του συζεύγματος και του υποστρώματος παράγει ορατές γαλάζιες/μωβ γραμμές για τις γραμμές ελέγχου ορού, συζεύγματος και αποκοπής. Εάν το δείγμα είναι θετικό για οποιαδήποτε από τις επικαλυμμένες με αντιγόνο γραμμές ανάλυσης, θα εμφανίσει εντονότερη αντίδραση από τη γραμμή αποκοπής. Οι αντιδράσεις διαβάζονται οπτικά και αναφέρονται ως θετικές, αρνητικές ή αμφίσημες (σε σύγκριση με τη γραμμή αποκοπής).

Υλικά που παρέχονται

ANA Advanced LIA [REF] 6011

Τα κιτ περιέχουν επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 20 προσδιορισμών.

20 x [STRIP|ANA Adv|LIA]

Ταινίες Ανάλυσης Ανοσοδοκιμασίας Γραμμής, που περιέχουν γραμμές ανάλυσης και γραμμές ελέγχου επικαλυμμένες με αντιπυρηνικό αντιγόνο. Έτοιμες προς χρήση.

1 x 120 μl [CONTROL|+|ANA]

Διάλυμα Θετικού Ελέγχου (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για ANA.

1 x 30 ml [CONJ|LIA]

Σύζευγμα IgG.

1 x 30 ml [SUBSTRATE]

Ενζυμικό Υπόστρωμα (κεχριμπαρένια φιάλη). Έτοιμο προς χρήση. Προστατεύεται από το φως.

1 x 40 ml [SAMPLE|DIL]

Διάλυμα Αραίωσης

1 x 50 ml [BUF|WASH|LIA]

Συμπύκνωμα Ρυθμιστικού Διαλύματος Έκπλυσης. Ανασυνθέστε το σε ένα λίτρο με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό ή όπως χρειάζεται αναλογικά.

2 x

LIA Δίσκοι Δοκιμασίας 10 κυψελίδων

1 x

Δελτίο Αναφοράς/Βαθμολόγησης

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες

[LOT]	Αριθμός Παρτίδας
[REF]	Αριθμός καταλόγου
[IVD]	Διαγνωστική χρήση in vitro
	Χρήση έως
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Αριθμός δοκιμών
	Κατασκευαστής
	Ημερομηνία κατασκευής

Απαιτούμενα Υλικά Που Δεν Παρέχονται

- Καθαρός ογκομετρικός κύλινδρος 1000 ml
- Μη οδοντωτή λαβίδα (λαβίδα φίλτρου)
- Αναδευτήρας ή δοχείο περιστροφικής πλατφόρμας
- Απορροφητικό χαρτί ή χαρτοπετσέτες
- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτα πλαστικά μπουκάλια για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης ή το απεσταγμένο νερό
- Πιπέτες ικανές να εγχύουν 10 έως 1000 μl
- Ρύγχη πιπετών μιας χρήσης
- Χρονόμετρο

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και Προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια φυλάσσονται στους 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.**

EL

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) και να αναμιχθούν επιμελώς πριν από τη χρήση. Μη χρησιμοποιείτε εάν το αντιδραστήριο δεν είναι καθαρό ή εάν υπάρχει αδιάλυτο ίζημα. Τα αντιδραστήρια παραμένουν σταθερά έως την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης όταν φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C και προστατεύονται από τις μολύνσεις, ή όπως αναγράφεται παρακάτω μετά το άνοιγμα και/ή την ανασύνθεση.

- Οι επικαλυμμένες με αντιγόνο ταινίες ανάλυσης [STRIP|ANA Adv|LIA] είναι έτοιμες προς χρήση. Αφήστε τη σακούλα με τις ταινίες ανάλυσης να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου προτού την ανοίξετε για να αποφύγετε την υγρασία της συμπύκνωσης και τη σχετική επιδείνωση. Επανασυσκευάστε τυχόν ταινίες ανάλυσης που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί και φυλάξτε τις σε θερμοκρασία 2-8°C σε σκοτεινό και ξηρό μέρος.
- Το Δείγμα Διαλύματος Αραίωσης [SAMPLE|DIL] είναι έτοιμο προς χρήση. Μετά το άνοιγμα, το Δείγμα Διαλύματος Αραίωσης [SAMPLE|DIL] παραμένει σταθερό για τουλάχιστον 8 εβδομάδες όταν φυλάσσεται σωστά και προστατεύεται από τις μικροβιακές ή χημικές μολύνσεις.
- Ανασυνθέστε 1 μέρος Συμπυκνώματος Ρυθμιστικού Διαλύματος Έκπλυσης [BUF|WASH|LIA] με 19 μέρη απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού για να δημιουργήσετε 1 λίτρο Ρυθμιστικού Διαλύματος Έκπλυσης. Το Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκπλυσης παραμένει σταθερό για τουλάχιστον 8 εβδομάδες όταν φυλάσσεται σωστά και προστατεύεται από τις μικροβιακές μολύνσεις.
- Το σύζευγμα IgG [CONJ|LIA] και το υπόστρωμα [SUBSTRATE] παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 8 εβδομάδες μετά το άνοιγμα όταν φυλάσσονται σωστά και προστατεύονται από τις μικροβιακές μολύνσεις. Το υπόστρωμα [SUBSTRATE] είναι ευαίσθητο στο φως και πρέπει να φυλάσσεται στην κεχριμπαρένια φιάλη η οποία παρέχεται.

Οι ταινίες αντιγόνου είναι μίας χρήσης. Μη εναλλάσσετε συστατικά από διαφορετικές παρτίδες. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα των ασθενών θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά μολυσματικά. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των παραπάνω υλικών.¹⁰

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το Proclin 300 είναι συντηρητικό. Κατά την απόρριψη υγρών που περιέχουν Proclin 300, ξεπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού για να επιτύχετε αραίωση των συστατικών κάτω από τα επίπεδα δραστηριότητας.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο. Μη εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης. Ακολουθήστε ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιήσετε τη μικροβιακή και διασταυρούμενη μόλυνση των αντιδραστηρίων όταν τα χειρίζεστε. Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά του kit μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση αυτής της ανάλυσης και συνεπώς δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2°-8°C για διάστημα που δεν υπερβαίνει τη μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Συνιστάται η ανάλυση των κατεψυγμένων δειγμάτων να πραγματοποιείται εντός ενός έτους. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Διαδικαστικές Σημειώσεις

- Διαβάστε προσεκτικά το Ένθετο του Προϊόντος προτού ξεκινήσετε τη δοκιμασία.
- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια ανάλυσης να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 λεπτά προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Τοποθετήστε όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια που δεν χρησιμοποιήσατε στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση.
- Η ορθή τεχνική έκπλυσης είναι πολύ σημαντική για την ικανοποιητική απόδοση της δοκιμασίας.

EL

- Χρησιμοποιήστε αποκλειστικά καθαρή λαβίδα ή γάντια για να αγγίζετε τις ταινίες ανάλυσης. Αποφύγετε να αγγίζετε τα λευκά σημεία με την επικάλυψη αντιγόνου.
- Οι γραμμές ανάλυσης βρίσκονται πάνω από τις γραμμές ελέγχου αποκοπής, ορού και συζεύγματος, όπως περιγράφεται στην απεικόνιση (Σχήμα 1). Οι γραμμές ελέγχου ορού και συζεύγματος εμφανίζονται στο ίδιο κομμάτι νιτροκυτταρίνης στο κάτω μέρος της ταινίας.
- Σημειώστε αναγνωριστικούς αριθμούς δειγμάτων στις αντίστοιχες ταινίες στο Έντυπο Αναφοράς. Κάθε ταινία αναγράφει τον αριθμό της ταινίας και τον αριθμό της παρτίδας στο κάτω μέρος για να μπορεί να αναγνωριστεί.
- Συμπληρώστε όλες τις σχετικές πληροφορίες στο Έντυπο Αναφοράς προτού ξεκινήσετε τη δοκιμασία.

Μέθοδος Ανάλυσης

- Βήμα 1** Χρησιμοποιώντας γάντια ή λαβίδα με στρογγυλεμένο άκρο, αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών. Προσέξτε να μην αγγίζετε με γυμνά χέρια ή με αιχμηρή λαβίδα τα σημεία τα οποία είναι επικαλυμμένα με αντιγόνο.
- Βήμα 2** Τοποθετήστε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών **STRIP|ANA Adv|LIA** με την πλευρά της ετικέτας προς τα πάνω στις ξεχωριστές κυψελίδες του δίσκου δοκιμασίας.
- Βήμα 3** Χρησιμοποιώντας την πιπέτα, κάντε έγχυση 1,5 ml του Διαλύματος Αραίωσης **SAMPLE|DIL** σε κάθε κυψελίδα. Βεβαιωθείτε ότι οι ταινίες βυθίζονται πλήρως στο υγρό.
- Βήμα 4** Επώαστε τις ταινίες στο Διάλυμα Αραίωσης **SAMPLE|DIL** για τουλάχιστον 10 λεπτά σε αναδευτήρα. Το γαλάζιο χρώμα στα σημεία με επικάλυψη αντιγόνου και στα σημεία ελέγχου αρχίζει να εξαφανίζεται καθώς εμποτίζεται η μεμβράνη.
- Βήμα 5** Χρησιμοποιώντας την πιπέτα, κάντε έγχυση 15 ml ορού ή θετικού διαλύματος δείγματος ελέγχου στις κατάλληλες κυψελίδες για να αποκτήσετε διάλυμα 1:101. Επώαστε 60 λεπτά (±5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα ή περιστρεφόμενο δοχείο.
- Βήμα 6** ΠΛΥΝΕΤΕ: Αναρροφήστε το δείγμα του διαλύματος στο δοχείο των απορριμμάτων. Πλύνετε σχολαστικά τις ταινίες με το ανασυσταθέν Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκπλυσης ρίχνοντας περίπου 2 ml διαλύματος απευθείας πάνω στις ταινίες. Πλύνετε τις ταινίες ανακινώντας ελαφρά για 5 λεπτά και αναρροφήστε το διάλυμα στο δοχείο των απορριμμάτων. Επαναλαμβάνετε την έκπλυση δύο ακόμα φορές.
- Προσοχή: Είναι σημαντικό να πλένονται πλήρως οι ταινίες μεταξύ των επώασσεων για να λάβετε έγκυρα αποτελέσματα. Μη κατάλληλη έκπλυση θα έχει ως αποτέλεσμα υψηλή χρώση υποβάθρου. Μην αφήνετε τις ταινίες να στεγνώσουν σε οποιοδήποτε στάδιο κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.
- Βήμα 7** Χρησιμοποιώντας την πιπέτα, κάντε έγχυση 1,0 ml του συζεύγματος **CONJ|LIA** σε κάθε κυψελίδα. Επώαστε 30 λεπτά (±5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα ή περιστρεφόμενο δοχείο.
- Βήμα 8** Επαναλάβετε το Βήμα 6.
- Βήμα 9** Χρησιμοποιώντας την πιπέτα, κάντε έγχυση 1,0 ml του υποστρώματος **SUBSTRATE|TMB** σε κάθε κυψελίδα και επώαστε, ανακινώντας ελαφρά 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και με χαμηλό φωτισμό. Οι γραμμές ελέγχου του ορού και του συζεύγματος αναπτύσσουν έντονο χρώμα μετά την επώαση στο υπόστρωμα. Η γραμμή ελέγχου αποκοπής εξελίσσεται σε κενή έως ελαφρά χρωματιστή γραμμή μετά την επώαση.
- Βήμα 10** Για να σταματήσετε την αντίδραση, ξεπλύνετε τις ταινίες 2x με απεσταγμένο/απιονισμένο νερό, ρίχνοντας περίπου 2 ml νερό απευθείας πάνω στις ταινίες και στη συνέχεια αναρροφώντας. Μην εμβυθίζετε/πλένετε για περισσότερο από 10 λεπτά, καθώς αυτό ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ευαισθησία των χρωματιστών γραμμών που αναπτύσσονται.
- Βήμα 11** Χρησιμοποιώντας λαβίδα με στρογγυλεμένο άκρο, αφαιρέστε τις ταινίες από το δίσκο δοκιμασίας και τοποθετήστε τις απαλά πάνω σε απορροφητικό χαρτί, αφήνοντάς τις να στεγνώσουν. Αφήστε τις ταινίες να στεγνώσουν πριν από την ανάλυση ή προτού τις κολλήσετε στο δελτίο αναφοράς/βαθμολόγησης.

Έλεγχος Ποιότητας

Διαδικαστικοί Έλεγχοι: Κάθε ταινία έχει τρεις διαδικαστικούς ελέγχους για την προσθήκη ορού και συζεύγματος και μια γραμμή αποκοπής για τον προσδιορισμό των ασθενών ή αρνητικών αντιδράσεων.

Διαλύματα Θετικού και Αρνητικού ελέγχου είναι διαθέσιμα ως προαιρετικά συστατικά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πρόσθετο ποιοτικό έλεγχο.

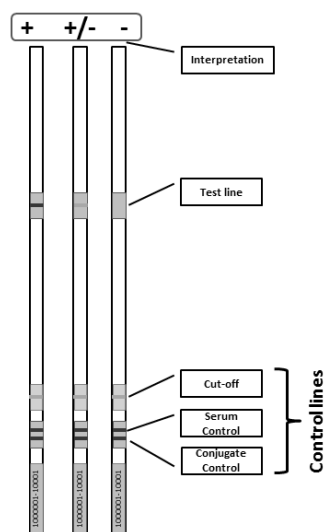
ΕΛ

Μεμονωμένα εργαστήρια αναμένεται να βελτιστοποιήσουν το χρόνο ανάπτυξης του υποστρώματος κατά +/- 4 λεπτά με βάση τον επεξεργαστή αποτυπώματος ή χειρωνακτικές μεθόδους που χρησιμοποιούν. Συνιστάται η γραμμή αποκοπής να είναι ελαφρώς ορατή στο μάτι, μετά την επώαση με το υπόστρωμα.

Ερμηνεία

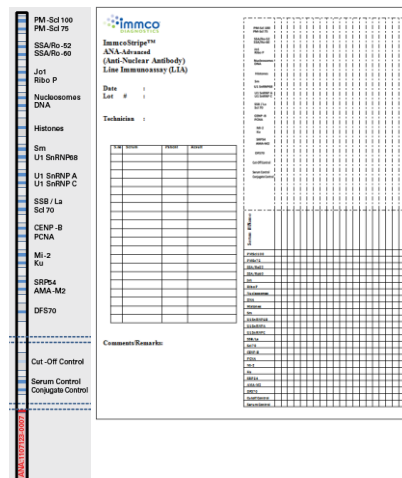
Οι ταινίες ανάλυσης περιέχουν γραμμές ελέγχου στο κάτω μέρος και γραμμή ανάλυσης πάνω από τους ελέγχους. Το κάτω άκρο της ταινίας ανάλυσης (κοντά στο σειριακό αριθμό) έχει τρεις γραμμές ελέγχου: τη γραμμή αποκοπής, τη γραμμή ελέγχου ορού και τη γραμμή ελέγχου συζεύγματος από πάνω προς τα κάτω. Η αποκοπή επιτρέπει στον τεχνικό να προσδιορίσει το αποτέλεσμα της ανάλυσης ως θετικό, αρνητικό ή αμφίσημο (+/-). Οι δύο γραμμές ελέγχου της διαδικασίας διασφαλίζουν την προσθήκη δείγματος, συζεύγματος και υποστρώματος.

Συγκρίνετε την αντίδραση των γραμμών ανάλυσης με εκείνες των ελέγχων. Η χρήση μεγεθυντικού φακού μπορεί να βοηθήσει στην παρατήρηση ασθενών αντιδράσεων.



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση αντιδράσεων ταινιών LIA με μία γραμμή ανάλυσης.

- Όπως αναγράφεται στην ετικέτα του Σχήματος 1, οι γραμμές ελέγχου του ορού και του συζεύγματος θα πρέπει να είναι εμφανώς θετικές, δείχνοντας την επιτυχία του πειράματος. Η αποκοπή είναι μια απαλή γραμμή με διακυμάνσεις ως προς την ένταση ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος. Η απεικόνιση στο Σχήμα 1 δείχνει ένα παράδειγμα γραμμής ανάλυσης. Στο ANA Advanced LIA (Σχήμα 2) υπάρχουν 22 γραμμές ανάλυσης και 3 γραμμές ελέγχου. Η ανάπτυξη της γραμμής ανάλυσης εξαρτάται από το δείγμα. Θετικές αντιδράσεις μπορεί να εμφανιστούν με διαφορετικές εντάσεις, από ασθενείς έως έντονες. **Οι ασθενείς αντιδράσεις θα πρέπει να συγκρίνονται με την ένταση της παρεχόμενης γραμμής αποκοπής εντός της ταινίας.** Αντιδράσεις οι οποίες είναι εμφανώς πιο σκούρες ή πυκνές από την ένταση της γραμμής αποκοπής θα πρέπει να θεωρούνται θετικές.
- Οι ταινίες ενδέχεται να παρουσιάζουν ομοιόμορφο ή αποχρωματισμένο φόντο λόγω διαφόρων παραγόντων επιρροής σε λιπαιμικούς ή αιμολυτικούς ορούς. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί επίσης να παρουσιαστεί εάν οι ταινίες ανάλυσης δεν έχουν επαρκές διάλυμα εμπλοκής ή αφεθούν κατά λάθος να στεγνώσουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.
- Σε περίπτωση ασθενών θετικών και αρνητικών αντιδράσεων, η ένταση της αντιδρώσας γραμμής θα πρέπει να συγκρίνεται με τη γραμμή αποκοπής για να προσδιοριστεί εάν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό (ασθενέστερη ένταση από τη γραμμή αποκοπής) ή αμφίσημο (+/-, απροσδιόριστο σε σύγκριση με τη γραμμή αποκοπής). Η οπτική αντίληψη ασθενών αντιδράσεων βελτιώνεται όταν οι ταινίες είναι εντελώς στεγνές. Αμφίσημα δείγματα θα πρέπει να επιβεβαιώνονται μέσω εναλλακτικής μεθόδου.



Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση Δελτίου Αναφοράς

- Οι ταινίες που έχουν στεγνώσει μπορούν να συγκεντρωθούν στο παρεχόμενο δελτίο αναφοράς/βαθμολόγησης. Το πλαστικό προστατευτικό κάλυμμα προσαρτάται μόνιμα στο δελτίο αναφοράς στο αριστερό άκρο. Αφαιρέστε προσεκτικά το πλαστικό κάλυμμα με κατεύθυνση από δεξιά προς τα αριστερά όπως θα ξεφυλλίζατε μια σελίδα ενός βιβλίου. Τοποθετήστε τις ταινίες που έχουν αντιδράσει επάνω στην κολλητική ταινία στην αντίστοιχη εσοχή και κλείστε, τοποθετώντας το πλαστικό κάλυμμα στη θέση του. Το προστατευτικό πλαστικό κάλυμμα είναι σχεδιασμένο για πολλαπλές χρήσεις για πολλαπλές συνεδρίες πειραμάτων και οι ταινίες μπορούν να συγκεντρωθούν στις αντίστοιχες εσοχές. Ο τεχνικός μπορεί να χρησιμοποιήσει το έντυπο για να καταγράψει τους αριθμούς παρτίδας των χρησιμοποιημένων αντιδραστικών, τον αριθμό του δείγματος και αποτελέσματα/σχόλια.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Μόνο δείγματα ορού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση αυτής της ανάλυσης και συνεπώς δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Μη φυλάσσετε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°-8°C για διάστημα που υπερβαίνει τη μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

Το ANA Advanced LIA θα πρέπει να χρησιμοποιείται αποκλειστικά ως βοήθημα για τη διάγνωση. Θετικά αποτελέσματα ενδέχεται να βρεθούν σε άλλες αυτοάνοσες νόσους ή ορισμένα λοιμώδη νοσήματα. Συνεπώς, τα αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογούνται και να ερμηνεύονται από ιατρική αρχή υπό το πρίσμα του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων εργαστηριακών ευρημάτων.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Σε τίτλο 1:40, αυξημένα επίπεδα αντιπυρηνικών και κυτταροπλασματικών αντισωμάτων ενδέχεται να είναι παρόντα σε έως 30% των ατόμων σε «φυσιολογικό» πληθυσμό, όπως προσδιορίζεται από τη μεθοδολογία Έμμεσου Ανοσοφθορισμού (IFA). Σε τίτλο 1:320 το ποσοστό θετικότητας στο φυσιολογικό πληθυσμό έχει αναφερθεί να μειώνεται σε περίπου 3%. Η επίπτωση της θετικότητας αυτοαντισωμάτων κυμαίνεται σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με τα συγκεκριμένα αντιγόνα, μελέτες και επιλεγμένες κοόρτες δειγμάτων. Οι αναμενόμενες τιμές σε φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρνητικές σε ανοσοδοκιμασία γραμμής (LIA). Πίνακες ανοσοδοκιμασίας γραμμής (LIA panels) έχουν σχεδιαστεί να παρέχουν βέλτιστη ευαισθησία και ειδικότητα. Συνιστάται να επιβεβαιώνεται το θετικό αποτέλεσμα μέσω εναλλακτικής μεθοδολογίας.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ**Ειδικότητες αντιγόνου**

Η Ανοσοδοκιμασία Γραμμής ANA Advanced είναι ικανή να ανιχνεύσει αντισώματα στα ακόλουθα αντιγόνα: PM-Scl100, PM-Scl75, Ro-52, Ro-60, Jo-1, Ribo-P, Νουκλεοσώματα, DNA, Ιστονικά, Sm, U1RNP68, U1RNP A, U1RNP C, SS-B/La, Scl-70, Cenp-B, PCNA, Mi-2, Ku, SRP-54 και AMA-M2 και DFS70 (LEDGF). Δείτε το Σχήμα 2 για μεμονωμένα αντιγόνα και θέσεις γραμμής ελέγχου.

Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα:

Ομάδα ορών δυνητικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας αυτοάνοσων νόσων από παθήσεις που δε σχετίζονται με αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) αναλύθηκε με χρήση της ανάλυσης ANA-Advanced LIA. 1 στους 550 προσδιορισμούς έδειξε θετική αντίδραση υποδεικνύοντας ειδικότητα 99,8% στο συγκεκριμένο πληθυσμό.

Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε αναμιγνύοντας ορούς με γνωστά επίπεδα αυτοαντισωμάτων για κάθε αναλύτη με δυνητικώς παρεμβαλλόμενα δείγματα ορού και μελετώντας την απόκλιση από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Δεν εκδηλώθηκε καμία σημαντική παρέμβαση για τα ακόλουθα υποστρώματα στα αναγραφόμενα επίπεδα: Αιμοσφαιρίνη (5 mg/ml), Χολερυθρίνη (0,4 mg/ml), Ρευματοειδής Παράγοντας (200 EU ισοδύναμο) και Τριγλυκερίδια (25 mg/ml). Μελέτες παρέμβασης έχουν διεξαχθεί σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων CLSI (δημοσίευση EP7-A2).

Αναπαραγωγιμότητα

Δοκιμασίες δειγμάτων αρνητικής κλίμακας, αμφίσημης και θετικής κλίμακας πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ποιοτικής αναπαραγωγιμότητας από πείραμα σε πείραμα και από χειριστή σε χειριστή. Τα αποτελέσματα έδειξαν 100% ποιοτική συμφωνία.



LIA para ANA avanzados ImmcoStripe™

Immunoensayo lineal (LIA) para la detección de anticuerpos antinucleares

IVD

ETIQUETA DEL PRODUCTO

REF 6011 LIA para anticuerpos antinucleares 20 Determinaciones
(ANA avanzados)

UTILIZACIÓN PREVISTA

Un immunoensayo lineal para la detección y la identificación de anticuerpos contra antígenos nucleares y citoplasmáticos asociados con enfermedades autoinmunes específicas de determinados órganos y sistémicas.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

En general, los métodos de laboratorio para detectar niveles de anticuerpos antinucleares (ANA) presentes en sueros se utilizan como ayuda en el diagnóstico de trastornos del tejido conjuntivo, incluyendo lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC), síndrome de Sjögren y esclerodermia.¹⁻⁵ Los ANA se producen en aproximadamente el 95 % de los pacientes con LES, así como también en pacientes con enfermedades del tejido conjuntivo. Los ANA también pueden producirse en otros trastornos como la hepatitis crónica activa y cirrosis biliar primaria.⁶⁻⁸

Los ANA no son específicos de una enfermedad; no obstante, la identificación de especificidades de determinados ANA puede utilizarse para confirmar el diagnóstico de una enfermedad en concreto o subconjunto de enfermedades. Las especificidades de los ANA se pueden determinar por la precipitación de la gelificación, hemaglutinación, IFA, ELISA, transferencia Western y otros métodos.

Los anticuerpos anti U-1 RNP son propios de pacientes con la EMTC. Los anticuerpos contra el antígeno Sm se producen exclusivamente en pacientes con LES. Los anticuerpos SS-A (Ro) se detectan en el síndrome de Sjögren y en pacientes con LES.¹ Los anticuerpos contra Jo-1 (histidil-ARNt sintetasa) se producen en pacientes con miositis.^{1,3} El SS-B (La) se presenta principalmente en pacientes con LES y en el síndrome de Sjögren. Los anticuerpos contra el 52 kD SS-A (Ro) y el 48 kD SS-B (La) se encuentran prácticamente en todos los pacientes con lupus eritematoso neonatal y con bloqueo cardíaco completo, y la presencia de ambos en pacientes con LES indica la aparición de la enfermedad en años posteriores y una frecuencia inferior de nefritis lúpica.⁹ Los anticuerpos Scl-70 reaccionan con topoisomerasa humana y se encuentran en pacientes con esclerodermia difusa. Los anticuerpos contra las proteínas asociadas a la remodelación de los nucleosomas y al mantenimiento del genoma como Mi2 y Ku, respectivamente, son un indicio de LES. Los autoanticuerpos contra los antígenos nucleares o citoplasmáticos dirigidos contra las ribonucleoproteínas implicadas en la síntesis de proteínas ("antisintetasa") como Jo1, PL-7, PL-12, EJ y OJ o el transporte transaccional (SRP54) se detectan aproximadamente en una quinta parte de los pacientes con polimiositis (PM) / dermatomiositis (DM). El panel del LIA para ANA avanzados puede detectar los anticuerpos contra la mayoría de los antígenos descritos anteriormente, así como también AMA-M2, un objetivo principal de los autoanticuerpos antimitocondriales, un elemento característico de la CBP (cirrosis biliar primaria). Los anticuerpos anti-DFS70 se han asociado con la población común. El panel del LIA para ANA avanzados ImmcoStripe™ es capaz de simplificar la detección de autoanticuerpos contra 22 antígenos claves que también se pueden observar por el sistema de prueba IFA en sustratos celulares HEP-2. Los antígenos siguientes se inmovilizan en las tiras de prueba: PM-Scl100, PM-Scl75, SSA/Ro52, SSA/Ro60, Jo1, Ribo-P, nucleosomas, ADN, histonas, Sm, U1SnRNP68, U1SnRNP A, U1SnRNP C, SSB/La, Scl70, CENP-B, PCNA, Mi2, Ku, SRP54, AMA-M2 y DFS70 (LEDGF). Además de las líneas de antígenos, se facilita una línea de control de corte, de suero y de conjugado en la parte inferior de la tira.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Para realizar el ensayo, las tiras se incuban con suero de paciente diluido. En sueros positivos, los anticuerpos se unen específicamente a una o más de las líneas de prueba de la tira. Las tiras se lavan siguiendo el protocolo y,

luego, el conjugado previamente diluido y listo para su utilización se añade a las tiras de prueba. Después de la incubación y las etapas de lavado, el sustrato listo para su utilización se añade a las tiras. Durante los 10 minutos de incubación, la unión de conjugado y sustrato produce unas líneas azules/violetas visibles para las líneas de control de suero, conjugado y corte. Si la muestra es positiva para cualquiera de las líneas de prueba recubiertas de antígeno, mostrará una reacción más intensa que la línea de corte. Las reacciones se leen visualmente y se registran como positivas, negativas o ambiguas (análogo a la línea de corte).

Materiales proporcionados

LIA para ANA avanzados **REF** 6011

El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 20 determinaciones.

20 x **STRIP** | **ANA Adv** | **LIA**

1 x 120 µl **CONTROL** | **+** | **ANA**

1 x 30 ml **CONJ** | **LIA**

1 x 30 ml **SUBSTRATE**

1 x 40 ml **SAMPLE** | **DIL**

1 x 50 ml **BUF** | **WASH** | **LIA**

2 x

1 x

Tiras de prueba para inmunoensayo lineal, que contienen líneas de prueba y líneas de control recubiertas de antígeno antinuclear. Listo para su utilización.

Control Positivo (tapón rojo). Contiene suero humano positivo para ANA.

Conjugado IgG.

Sustrato de enzima (botella ámbar). Listo para su utilización. **Proteger de la luz**.

Diluyente

Tapón de lavado concentrado. **Reconstituir a un litro** con agua desionizada o destilada o según se necesite proporcionalmente.

Bandejas de ensayo LIA 10

Hoja de informe/puntuación

Símbolos utilizados en las etiquetas



Número de lote



Número de catálogo



Utilización diagnóstica in vitro



Utilizar antes de



Temperatura de almacenamiento



Consulte las instrucciones de uso



Número de análisis



Fabricante



Fecha de fabricación

Materiales necesarios pero no suministrados

- Probeta graduada limpia de 1000 ml
- Fórceps sin dientes (Fórceps para filtro)
- Graneador o agitador de plataforma giratoria
- Papel absorbente o toallitas de papel
- Agua desionizada o destilada
- Botellas de plástico blando para almacenar tapón de lavado diluido o agua destilada
- Pipetas capaces de suministrar de 10 µl a 1000 µl
- Extremos de pipeta desechables
- Temporizador

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conserve todos los reactivos entre 2 y 8 °C. **No los congele.**

Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-25 °C) y mezclarse de forma homogénea antes de su utilización. No lo utilice si el reactivo no está limpio o si contiene un precipitado insoluble. Los reactivos permanecen estables hasta la fecha de caducidad, mientras se almacenen a una temperatura entre 2 y 8 °C y se preserven de la contaminación, o tal como se indica a continuación una vez abierto o tras la reconstitución.

- Las tiras de prueba recubiertas de antígeno **STRIP|ANA Adv|LIA** están listas para su utilización. Deje que la bolsa que contiene las tiras de prueba alcance la temperatura ambiente antes de abrirla para evitar la condensación y el deterioro asociado. Vuelva a colocar en la bolsa las tiras de prueba que no utilice y almacénela entre 2 y 8 °C en un lugar seco y oscuro.
- El diluyente de muestra **SAMPLE|DIL** está listo para su utilización. Una vez abierto, el diluyente de muestra **SAMPLE|DIL** estará estable durante al menos 8 semanas mientras se almacene adecuadamente y se preserve de la contaminación microbiana o química.
- Reconstituir 1 parte de **BUF|WASH|LIA** en 19 partes de agua destilada o desionizada para obtener 1 litro de tapón de lavado. El tapón de lavado estará estable durante al menos 8 semanas tras la reconstitución mientras se almacene adecuadamente y se preserve de la contaminación microbiana.
- **CONJ|LIA** y **SUBSTRATE** estarán estables durante al menos 8 semanas tras su apertura mientras se almacenen adecuadamente y se preserven de la contaminación microbiana. **SUBSTRATE** es sensible a la luz y debe almacenarse en la botella ámbar que se proporciona.

Las tiras de antígeno se pueden utilizar sólo una vez. No cambie los componentes de lotes diferentes. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas.

Precauciones

Todos los componentes provenientes de seres humanos utilizados han sido analizados en busca de HBsAg, HCV, HIV-1 y 2 y HTLV-I y han dado negativo de acuerdo con los exámenes necesarios de la FDA. Sin embargo, los derivados de sangre humana y las muestras de pacientes deberían considerarse potencialmente infecciosos. Siga unas buenas prácticas de laboratorio a la hora de guardar, preparar y desechar los materiales indicados.¹⁰

ADVERTENCIA: Proclin 300 es un conservante. A la hora de desechar líquidos que contengan Proclin 300, lave con abundante agua para diluir los componentes por debajo de los niveles activos.

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

RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECÍMENES

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes con hemólisis intensa, niveles altos de lípidos o contaminación microbiana pueden interferir con el rendimiento del análisis y, por lo tanto, no deben utilizarse. Conserve los especímenes entre 2º y 8 °C durante un tiempo máximo de una semana. Para períodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Se recomienda analizar los especímenes congelados en el plazo de un año. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente.

PROCEDIMIENTO

Notas del procedimiento

- Lea detenidamente la etiqueta del producto antes de comenzar el ensayo.
- Deje que los especímenes de suero y los reactivos de prueba alcancen la temperatura ambiente durante 30 minutos aproximadamente antes de comenzar con el procedimiento de análisis. Vuelva a meter todos los reactivos y especímenes no utilizados en la nevera inmediatamente después de su utilización.
- Una técnica de lavado adecuada es fundamental para alcanzar satisfactoriamente el rendimiento del ensayo.
- Manipule las tiras de prueba únicamente con fórceps o guantes limpios. Evite tocar las zonas blancas recubiertas de antígeno.
- Las líneas de prueba están colocadas por encima de las líneas de control de corte, suero y conjugado como se describe en el esquema (Figura 1). Las líneas de control de suero y conjugado aparecen en la misma sección de nitrocelulosa en la parte inferior de la tira.

- Asigne números de identificación de especímenes a las tiras correspondientes en el Formulario de informe. Cada tira tiene un número de tira y un número de lote impreso en la parte inferior para que pueda ser localizada.
- Rellene toda la información pertinente en el Formulario de informe antes de comenzar con el ensayo.

Método de análisis

- Paso 1** Utilizando guantes o fórceps hemostáticos, desprege la cantidad necesaria de tiras. Se debe procurar no tocar las zonas recubiertas de antígeno con las manos desnudas o fórceps puntiagudos.
- Paso 2** Coloque la cantidad necesaria de **STRIPANA AdvLIA** con la etiqueta mirando hacia arriba en los pozos individuales de la bandeja de ensayo.
- Paso 3** Pipetee 1,5 ml de **SAMPLEDIL** en cada pozo, asegurándose de que las tiras quedan totalmente sumergidas en el líquido.
- Paso 4** Incube las tiras en **SAMPLEDIL** durante al menos 10 minutos en un graneador. El color azul en el antígeno recubierto y lugares de control empieza a desaparecer una vez se empape la membrana.
- Paso 5** Pipetee 15 µl de suero o muestra de control positivo en los pozos adecuados para obtener una dilución de 1:101. Incúbelo 60 minutos (±5 min.) a temperatura ambiente en un graneador o agitador giratorio.
- Paso 6** LAVADO: Aspire la solución de muestra en el contenedor de residuos. Lave minuciosamente las tiras con tapón de lavado **reconstituido** aplicando aproximadamente 2 ml de solución directamente en las tiras. Lave las tiras agitándolas suavemente durante 5 minutos y aspire la solución en el contenedor de residuos. Repita el lavado dos veces más.
- Precaución: Un lavado completo de las tiras entre las incubaciones es fundamental para obtener unos resultados válidos. Un lavado inadecuado implicaría una coloración de fondo elevada. No deje que las tiras se resequen en ninguna de las etapas durante el ensayo.
- Paso 7** Pipetee 1,0 ml de **CONJLIA** en cada pozo. Incúbelo 30 minutos (±5 min.) a temperatura ambiente en un graneador o agitador giratorio.
- Paso 8** Repita el paso 6.
- Paso 9** Pipetee 1,0 ml de **SUBSTRATE TMB** en cada pozo e incúbelo agitando suavemente durante 10 minutos a temperatura ambiente y con poca iluminación. Las líneas de control de suero y conjugado adquieren un color intenso después de la incubación en el sustrato. La línea de control de corte desarrolla una línea coloreada de vacío a débil después de la incubación.
- Paso 10** Para detener la reacción, enjuague las tiras dos veces con agua destilada/desionizada aplicando aproximadamente 2 ml de agua directamente en las tiras y, a continuación, aspírelas. No las empape/lave durante más de 10 minutos, puesto que esto podría disminuir la sensibilidad de las líneas coloreadas que se han desarrollado.
- Paso 11** Utilizando unos fórceps hemostáticos retire las tiras de la bandeja de ensayo y colóquelas suavemente en papel absorbente y déjelas que se sequen. Deje que las tiras se sequen antes de analizarlas o colocarlas en la hoja de informe/puntuación.

Control de calidad

Controles de procedimiento: Cada tira tiene tres controles de procedimiento para la adición de suero o conjugado y una línea de corte para determinar las reacciones débiles o negativas.

Los controles positivos y negativos están disponibles como componentes opcionales y se pueden realizar como control de calidad adicional.

Se espera que los análisis individuales mejoren el tiempo del desarrollo del sustrato en +/- 4 minutos basándose en el procesador de transferencia o métodos manuales. Se sugiere que la línea de corte sea una línea débilmente visible después de las incubaciones con sustrato.

Interpretación

Las tiras de prueba contienen líneas de control en la parte inferior y línea de prueba encima de los controles. La parte inferior de la tira de prueba (cerca del número de serie) tiene tres líneas de control: la línea de corte, la línea de control de suero y la línea de control de conjugado desde arriba hasta abajo. El corte le permite al técnico determinar si el resultado es positivo, negativo o indeterminado (+/-). Las dos líneas de control del procedimiento aseguran la adición de espécimen, conjugado o sustrato.

Compare la reacción de las líneas de prueba con aquellas de los controles. Utilice una lupa para ayudarlo en la observación de las reacciones débiles.

- Como aparece en la etiqueta de la Figura 1, las líneas de control de suero y conjugado deben ser claramente positivas indicando que el experimento tuvo éxito. El corte es una línea débil con variación en intensidad basado en las condiciones experimentales. El esquema de la Figura 1 muestra un ejemplo de línea de prueba. En el LIA para ANA avanzados (Figura 2) hay 22 líneas de prueba y 3 líneas de control. El desarrollo de la línea de prueba depende de la muestra. Las reacciones positivas pueden presentar intensidades variables de débil a fuerte. **Las reacciones débiles deben compararse con la intensidad de la línea de corte que se facilita en la tira.** Las reacciones que son claramente

más oscuras o más densas que la intensidad de la línea de corte deben considerarse positivas.

- Las tiras deben mostrar un fondo descolorido u homogéneo debido a los diversos factores que interfieren en los sueros lipémicos o hemolíticos. Asimismo, este efecto se puede ver si las tiras de prueba no se bloquean lo suficiente o se permite accidentalmente que se sequen durante el ensayo.
- En caso de reacciones positivas o negativas débiles, la intensidad de la línea de reacción debe compararse con la línea de corte para determinar el resultado como negativo (intensidad más débil que la línea de corte) o ambiguo (+/-, indistinguible de la línea de corte). La visualización de las reacciones débiles se mejora cuando las tiras están completamente secas. Las muestras ambiguas deben confirmarse siguiendo un método alternativo.
- Las tiras secas se pueden agrupar en la hoja de informe/puntuación que se facilita. La tapa de protección de plástico está fija permanentemente a la hoja de informe en el borde izquierdo. Despegue con cuidado la tapa de plástico de derecha a izquierda como al pasar la página de un libro. Coloque las tiras de reacción en la cinta adhesiva en el espacio correspondiente y vuelva a colocar la tapa de plástico en su lugar. La tapa de protección de plástico está diseñada para que se reutilice en múltiples secciones de experimentos y las tiras se pueden colocar en los espacios correspondientes. El técnico puede utilizar el formulario para registrar los números de lote de los reactivos utilizados, el número de espécimen y los resultados/comentarios.

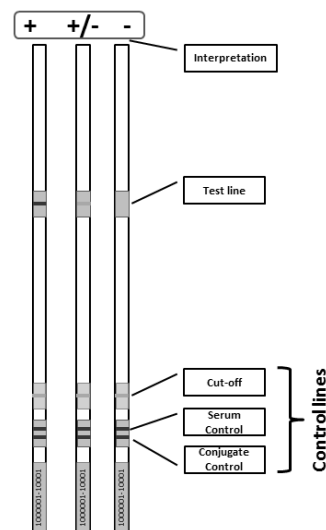


Figura 1: Esquema de tiras LIA de reacción con una línea de prueba.

Figura 2: Esquema de la hoja de informe

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

El LIA para ANA avanzados solo debe utilizarse como ayuda en el diagnóstico. Los resultados positivos se pueden encontrar en otras condiciones autoinmunitarias o ciertas enfermedades infecciosas. Como

consecuencia una autoridad médica debe valorar e interpretar los resultados en función del historial clínico del paciente y otros resultados de laboratorio.

VALORES ESPERADOS

En el título 1:40, los niveles elevados de anticuerpos antinucleares y citoplasmáticos pueden estar presentes en más del 30 % de los individuos de una población "normal", tal como determina el método IFA. En un título de tasa de positividad de 1:320 en la población normal se ha indicado una caída de aproximadamente el 3 %. La incidencia de positividad de autoanticuerpos varía en gran medida basada en los antígenos específicos, estudios y cohorte seleccionado de especímenes. Los valores esperados en una población normal son negativos en el LIA. Los paneles del LIA están diseñados para ofrecer una sensibilidad y especificidad óptimas. Se recomienda confirmar el resultado positivo con un método alternativo.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Especificidades de los antígenos

El LIA para ANA avanzados es capaz de detectar autoanticuerpos contra los siguientes antígenos: PM-Scl100, PM-Scl75, Ro-52, Ro-60, Jo-1, Ribo-P, nucleosomas, ADN, histonas, Sm, U1RNP68, U1RNP A, U1RNP C, SS-B/La, Scl-70, Cenp-B, PCNA, Mi-2, Ku, SRP-54 y AMA-M2 y DFS70 (LEDGF). Consulte la Figura 2 para obtener antígenos individuales y puestos de línea de control.

Reactividad cruzada

Un panel de sueros de enfermedades autoinmunes potencialmente con reactividad cruzada de las condiciones no asociadas con los ANA se analizó utilizando la prueba LIA para ANA avanzados. Una de 550 determinaciones demuestra una reacción positiva, lo que indica una especificidad del 99,8 % en esta población.

Interferencia

La interferencia se estudió mezclando sueros con niveles de autoanticuerpos conocidos para cada analítico con muestras potenciales de suero interferentes y estudiando la desviación de los resultados esperados. No se demostró una interferencia importante para las siguientes sustancias en los niveles indicados: hemoglobina (5 mg/ml), bilirrubina (0,4 mg/ml), factor reumatoideo (200 EU equivalente) y triglicéridos (25 mg/ml). Las pruebas de interferencia se han realizado según las directrices del CLSI (publicación EP7-A2).

Reproducibilidad

Los ensayos de muestras en el ámbito negativo, ambiguo o positivo se realizaron para determinar la reproducibilidad cualitativa de prueba a prueba y de operador a operador. Los resultados produjeron un acuerdo cualitativo del 100 %.

ImmcoStripe™ ANA Advanced LIA

Linienimmunoassay (LIA) zur Erkennung von antinukleären Antikörpern

IVD

BEIPACKTEXT

REF 6011 Anti-Nuclear (ANA-Advanced) 20 Bestimmungen
Antibody LIA

VERWENDUNGSZWECK

Ein Linienimmunoassay zur Erkennung und Identifikation von Antikörpern zu nukleären und zytoplasmatischen Antigenen verbunden mit systemischen und bestimmten organspezifischen Autoimmunerkrankungen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Labormethoden, um Spiegel von antinukleären Antikörpern (ANA) in Seren zu erkennen, werden allgemein verwendet, um bei der Diagnose von Bindegewbserkrankungen einschließlich systemischem Lupus erythematodes (SLE), Mischkollagenose (MCTD), Sjögren-Syndrom und Sklerodermie zu unterstützen¹⁻⁵ ANA treten bei ungefähr 95 % der SLE- Patienten sowie bei Patienten mit anderen Bindegewbserkrankungen auf. ANA können auch bei anderen Erkrankungen, wie beispielsweise chronisch aktiver Hepatitis und primärer biliärer Zirrhose, auftreten.⁶⁻⁸

ANA sind nicht krankheitsspezifisch; jedoch kann die Identifikation bestimmter ANA-Spezifitäten verwendet werden, um die Diagnose einer bestimmten Krankheit oder Krankheitsuntermenge zu unterstützen. ANA-Spezifitäten können mittels Gelpräzipitation, Hämagglutination, IFA, ELISA, Westernblot und anderen Verfahren bestimmt werden.

Antikörper zu U-1 RNP sind charakteristisch für MCTD-Patienten. Antikörper zum Sm-Antigen treten ausschließlich bei SLE auf. SS-A (Ro) Antikörper werden beim Sjögren-Syndrom und bei SLE nachgewiesen.¹ Antikörper zu Jo-1 (Histidyl-tRNA-Synthetase) treten bei Patienten mit Myositis auf.^{1,3} SS-B (La) wird hauptsächlich bei SLE und Sjögren-Syndrom berichtet. Antikörper sowohl zu 52 kD SS-A (Ro) als auch zu 48 kD SS-B (La) sind praktisch bei allen Patienten mit neonatalem Lupus Erythematodes und komplettem Herzblock zu finden. Die Anwesenheit von beiden bei SLE weist auf einen späteren Krankheitsbeginn als auch auf eine geringere Häufigkeit von Lupusnephritis hin.⁹ Scl-70-Antikörper reagieren mit menschlicher Topoisomerase und sind bei Patienten mit diffuser Sklerodermie zu finden. Antikörper zu Proteinen, die mit der Nukleosomumbildung und Genomerhaltung verbunden sind, wie beispielsweise Mi2 und Ku, sind jeweils ein Hinweis auf SLE. Autoantikörper gegen nukleäre oder zytoplasmatische Antigene, die gegen Ribonukleoproteine gerichtet sind, welche an der Proteinsynthese („Antisynthetase“) beteiligt sind, wie beispielsweise Jo1, PL 7, PL 12, EJ und OJ oder translationaler Transport (SRP54), sind bei ungefähr einem Fünftel der Patienten mit Polymyositis (PM) / Dermatomyositis (DM) feststellbar. ANA Advanced LIA kann Antikörper gegen die meisten der oben beschriebenen Antigene sowie gegen AMA-M2, einem hauptsächlich Ziel von Antimitochondrial-Autoantikörpern, einem besonderen Merkmal von PBC (primäre biliäre Leberzirrhose), erkennen. Anti-DFS70-Antikörper sind mit normaler Population in Verbindung gebracht worden. ImmcoStripe™ ANA-Advanced LIA kann die Erkennung von Autoantikörpern gegen 22 entscheidende Antigene vereinfachen, die auch anhand von IFA-Screening bei HEp-2-Zellsubstraten beobachtet werden können. Die folgenden Antigene sind auf den Teststreifen immobilisiert: PM-Scl100, PM-Scl75, SSA/Ro52, SSA/Ro60, Jo1, Ribo-P, Nukleosom, DNA, Histone, Sm, U1SnRNP68, U1SnRNP A, U1SnRNP C, SSB/La, Scl70, CENP-B, PCNA, Mi2, Ku, SRP54, AMA-M2 und DFS70 (LEDGF). Zusätzlich zu den Antigenlinien ist eine Cut-Off-, Serum- und Konjugat-Kontrolllinie an der Unterseite des Streifens vorgesehen.

GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS

Zur Ausführung des Tests werden Streifen mit dem verdünnten Patientenserum inkubiert. Bei positiven Seren binden sich Antikörper speziell an eine oder mehrere der Testlinien auf dem Streifen. Die Streifen werden gemäß dem Protokoll gewaschen und dann wird das vorverdünnte gebrauchsfertige Konjugat zu den Teststreifen hinzugefügt. Nach der Inkubation und den Waschschritten wird das gebrauchsfertige Substrat zu den Streifen hinzugefügt.

DE

Während einer 10-minütigen Inkubation erzeugt die Konjugat- und Substratbindung sichtbare blaue/violette Linien für Serum-, Konjugat- und Cut-Off-Kontrolllinien. Wenn die Probe bei irgendeiner der mit Antigen beschichteten Testlinien positiv ist, zeigt sie eine Reaktion, die intensiver ist als die Cut-Off-Linie. Die Reaktionen werden visuell abgelesen und als positiv, negativ oder zweideutig (im Vergleich zur Cut-off-Linie) angegeben.

Mitgelieferte Materialien

ANA Advanced LIA **REF** 6011

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von 20 Bestimmungen.

20 x **STRIP|ANA Adv|LIA**

1 x 120 µl **CONTROL|+|ANA**

1 x 30 ml **CONJ|LIA**

1 x 30 ml **SUBSTRATE**

1 x 40 ml **SAMPLE|DIL**

1 x 50 ml **BUF|WASH|LIA**

2 x

1 x

Linienimmunoassay-Teststreifen, die antinukleäre mit Antigen beschichtete Testlinien und Kontrolllinien enthalten. Gebrauchsfertig.

Positivkontrolle (rote Kappe). Enthält ANA-positives Humanserum.

IgG Konjugat.

Enzymsubstrat (bernsteinfarbene Flasche). Gebrauchsfertig. **Vor Licht schützen**.

Verdünner

Waschpuffer-Konzentrat. Zu einem Liter mit deionisiertem oder destilliertem Wasser oder wie erforderlich proportional rekonstituieren.

LIA 10-Well Assay-Platten.

Berichts-/Auswertungsformular.

Auf den Etiketten verwendete Symbole

LOT	Chargennummer
REF	Katalognummer
IVD	In vitro diagnostischer Gebrauch
	Verwenden bis
	Lagertemperatur
	Finden Sie Anweisungen für die Verwendung
	Anzahl an Tests
	Hersteller
	Herstellungsdatum

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Sauberer 1000-ml-Messzylinder.
- Nicht gezahnte Pinzette (Filter-Pinzette).
- Wippschüttler
- Saugfähiges Papier oder saugfähige Papiertücher
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflaschen für den verdünnten Waschpuffer oder destilliertes Wasser
- Pipetten für 10 bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Stoppuhr

REAGENZIEN

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern; **nicht einfrieren**.

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18-25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden. Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder unlösliche Partikel enthält. Die Reagenzien sind bis zum angegebenen Ablaufdatum stabil, wenn sie bei 2-8 °C und geschützt vor Verunreinigung oder wie nachfolgend angegeben nach dem Öffnen und/oder der Rekonstitution aufbewahrt werden.

- Mit Antigen beschichtete Teststreifen **STRIP|ANA Adv|LIA** sind gebrauchsfertig. Lassen Sie bitte den Teststreifenbeutel vor dem Öffnen Raumtemperatur erreichen, um eine Kondensation und damit

DE

verbundene Verschlechterung zu vermeiden. Verpacken Sie bitte nicht genutzte Teststreifen und bewahren Sie sie bei 2-8 °C und dunklen und trockenen Bedingungen auf.

- Probenverdünner [SAMPLE DIL] ist gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen ist der Probenverdünner [SAMPLE DIL] für mindestens 8 Wochen haltbar, wenn er richtig gelagert und vor mikrobieller oder chemischer Verunreinigung geschützt wird.
- Rekonstituieren Sie 1 Teil [BUF WASH LIA] in 19 Teilen destilliertem oder vollentsalztem Wasser, damit sich 1 Liter Waschpuffer gibt. Der Waschpuffer ist für mindestens 8 Wochen nach der Rekonstitution haltbar, wenn er richtig gelagert und vor mikrobieller Verunreinigung geschützt wird.
- [CONJ LIA] und [SUBSTRATE] sind für mindestens 8 Wochen nach der Öffnung haltbar, wenn sie richtig gelagert und vor mikrobieller Verunreinigung geschützt werden. [SUBSTRATE] ist lichtempfindlich und muss in der bereitgestellten bernsteinfarbenen Flasche gelagert werden.

Die Antigenstreifen können nur einmal verwendet werden. Tauschen Sie Komponenten von unterschiedlichen Chargen nicht untereinander aus. Verwenden Sie die Reagenzien nicht nach dem auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatum.

Vorsichtsmaßnahmen

Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten als potenziell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie die Regeln der guten Laborpraxis bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung der oben genannten Materialien.¹⁰

WARNUNG - Proclin 300 ist ein Konservierungsmittel. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten, die Proclin 300 enthalten, mit reichlich Wasser nach, um die Komponenten bis unter aktive Spiegel zu verdünnen.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kit-Komponenten nicht mit denjenigen von anderen Quellen aus. Befolgen Sie die Regeln der Guten Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatum verwenden.

PROBENENTNAHME UND HANDLING

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Proben mit starker Hämolyse, erhöhter Lipid- oder mikrobieller Verunreinigung können die Leistung des Tests beeinflussen und dürfen deshalb nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Es wird empfohlen, eingefrorene Proben innerhalb eines Jahres zu prüfen. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie den Beipacktext vor dem Beginn des Tests sorgfältig durch.
- Lassen Sie die Serumproben und Testreagenzien ungefähr 30 Minuten vor dem Beginn des Testverfahrens Raumtemperatur erreichen. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Eine gute Waschmethode ist für zufriedenstellende Leistungen des Tests entscheidend.
- Behandeln Sie Teststreifen nur mit einer sauberen Pinzette oder Handschuhen. Vermeiden Sie das Berühren der weißen mit Antigen beschichteten Bereiche.
- Die Testlinien sind über den Cut-Off-, Serum- und Konjugat-Kontrolllinien platziert, wie es in der schematischen Darstellung gezeigt ist (Abbildung 1). Serum- und Konjugat-Kontrolllinien erscheinen auf dem gleichen Teil der Nitrocellulose an der Unterseite des Streifens.
- Ordnen Sie Proben-Identifikationsnummern den entsprechenden Streifen auf dem Berichtsformular zu. Auf jedem Streifen ist die Streifennummer und Chargennummer auf der Unterseite zur Rückverfolgbarkeit aufgedruckt.
- Tragen Sie alle anderen relevanten Informationen im Berichtsformular ein, bevor Sie mit dem Test beginnen.

DE Testmethode

- Schritt 1** Ziehen Sie unter Verwendung von Handschuhen oder einer abgerundeten Pinzette die erforderliche Anzahl an Streifen ab. Lassen Sie Vorsicht walten, um die mit Antigen beschichteten Bereiche nicht mit bloßen Händen oder einer spitzen Pinzette zu berühren.
- Schritt 2** Platzieren Sie die erforderliche Anzahl an Streifen **[STRIP|ANA Adv|LIA]** mit der bezeichneten Seite nach oben in individuelle Vertiefungen der Assay-Platte.
- Schritt 3** Pipettieren Sie 1,5 ml **[SAMPLE|DIL]** in jede Vertiefung; Stellen Sie sicher, dass die Streifen vollständig in die Flüssigkeit eingetaucht sind.
- Schritt 4** Inkubieren Sie die Streifen in **[SAMPLE|DIL]** für mindestens 10 Minuten auf einem Wippschüttler. Die blaue Farbe im beschichteten Antigen und den Kontrollstellen beginnt zu verschwinden, während die Membran durchnässt wird.
- Schritt 5** Pipettieren Sie 15 µl des Serums oder der positiven Kontrollprobe in die entsprechenden Vertiefungen, um eine 1:101-Verdünnung zu erhalten. Inkubieren Sie 60 Minuten (±5 min.) bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler.
- Schritt 6** **WASCHEN:** Saugen Sie die Probenlösung in den Abfallbehälter ab. Waschen Sie die Streifen gründlich mit dem **rekonstituierten** Waschpuffer, indem Sie ungefähr 2 ml der Lösung direkt auf die Streifen spritzen. Waschen Sie die Streifen mit einer sanften Bewegung für 5 Minuten und saugen Sie die Lösung in den Abfallbehälter ab. Wiederholen Sie die Wäsche noch zwei Mal.
Vorsicht: Das vollständige Waschen der Streifen zwischen Inkubationen ist entscheidend, um gültige Ergebnisse zu erhalten. Falsches Waschen resultiert in hoher Hintergrundfärbung. Lassen Sie nicht zu, dass die Streifen bei irgendeinem Schritt während des Tests trocken werden.
- Schritt 7** Pipettieren Sie 1,0 ml **[CONJ|LIA]** in jede Vertiefung. Inkubieren Sie 30 Minuten (±5 Min.) bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler.
- Schritt 8** Wiederholen Sie Schritt 6.
- Schritt 9** Pipettieren Sie 1,0 ml **[SUBSTRATE|TMB]** in jede Vertiefung und inkubieren Sie mit sanftem Schütteln 10 Minuten bei Raumtemperatur unter reduziertem Licht. Die Serum- und Konjugat-Kontrolllinien entwickeln eine intensive Farbe nach der Inkubation im Substrat. Die Cut-Off-Kontrolllinie entwickelt sich nach der Inkubation in eine leere bis schwach farbige Linie.
- Schritt 10** Um die Reaktion zu stoppen, spülen Sie die Streifen 2x mit destilliertem/vollentsalztem Wasser aus, indem Sie ungefähr 2 ml Wasser direkt auf die Streifen spritzen und dann absaugen. Tränken/waschen Sie nicht für länger als 10 Minuten, da dies in verminderter Empfindlichkeit der entwickelten farbigen Linien resultieren kann.
- Schritt 11** Entfernen Sie unter Verwendung einer abgerundeten Pinzette Streifen von der Assay-Platte, platzieren Sie sie sanft auf saugfähigem Papier und lassen Sie sie trocknen. Lassen Sie die Streifen vor der Analyse oder dem Befestigen am Berichts-/Auswertungsformular trocken werden.

Qualitätskontrolle

Funktionskontrollen: Jeder Streifen hat drei Funktionskontrollen für die Hinzufügung des Serums und Konjugats und eine Cut-Off-Linie, um die schwachen oder negativen Reaktionen zu bestimmen. Positiv- und Negativkontrollen sind als optionale Komponenten verfügbar und können als zusätzliche Qualitätskontrolle verwendet werden.

Von individuellen Laboren wird erwartet, dass sie die Substratentwicklungszeit um +/-4 Minuten basierend auf dem Blot-Prozessor oder einer manuellen Methodik optimieren. Es wird empfohlen, dass die Cut-Off-Linie nach der Inkubation mit dem Substrat für das Auge schwach sichtbar sein sollte.

Interpretation

Die Teststreifen enthalten Kontrolllinien an der Unterseite und Testlinien über den Kontrollen. Das untere Ende des Teststreifens (in der Nähe der Seriennummer) hat drei Kontrolllinien: die Cut-Off-Linie, die Serum-Kontrolllinie und die Konjugat-Kontrolllinie von oben nach unten. Der Cut-Off ermöglicht dem Techniker, das Prüfergebnis als positiv, negativ oder unbestimmt (+/-) zu bestimmen. Die zwei Kontrolllinien des Verfahrens stellen die Hinzufügung der Probe, des Konjugats und des Substrats sicher.

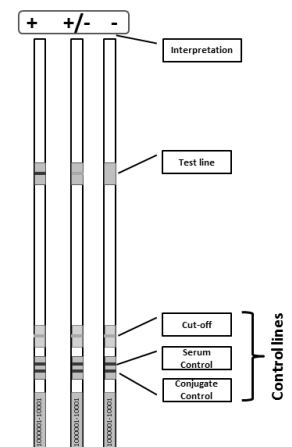


Abbildung 1: Schematische Darstellung von reagierten LIA-Streifen mit einer Testlinie.

DE

Vergleichen Sie die Reaktion der Testlinien mit denjenigen der Kontrollen. Das Verwenden eines Vergrößerungsglases kann bei der Beobachtung von schwachen Reaktionen unterstützen.

- Wie bezeichnet in Abbildung 1 sollten die Serum- und Konjugat-Kontrolllinien eindeutig positiv sein, was ein erfolgreiches Experiment anzeigt. Der Cut-Off ist eine schwache Linie mit Variation in der Intensität basierend auf den Versuchsbedingungen. Die schematische Darstellung in Abbildung 1 zeigt eine beispielhafte Testlinie. Bei ANA Advanced LIA (Abbildung 2) gibt es 22 Testlinien und 3 Kontrolllinien. Die Testlinienentwicklung hängt von der Probe ab. Positive Reaktionen können mit variierenden Intensitäten von schwach bis stark auftreten. **Schwache Reaktionen sollten sich im Vergleich zur Intensität der bereitgestellten Cut-Off-Linie innerhalb des Streifens befinden.** Reaktionen, die deutlich dunkler oder dichter sind als die Intensität der Cut-Off-Linie sollten als positiv betrachtet werden.
- Streifen können aufgrund verschiedener beeinträchtigender Faktoren bei lipämischen oder hämolytischen Seren einen homogenen oder verfärbten Hintergrund zeigen. Dieser Effekt kann auch auftreten, wenn die Teststreifen nicht ausreichend blockiert werden oder es ihnen versehentlich ermöglicht wird, während des Tests auszutrocknen.
- Im Falle von schwachen positiven und negativen Reaktionen sollte die reagierte Linienintensität mit der Cut-Off-Linie verglichen werden, um das Ergebnis als negativ (schwächere Intensität als die Cut-Off-Linie) oder zweideutig (+/-; Ununterscheidbar von der Cut-Off-Linie) zu bestimmen. Die Visualisierung von schwachen Reaktionen wird verbessert, wenn die Streifen vollständig trocken sind. Zweideutige Proben sollten durch ein alternatives Verfahren bestätigt werden.
- Getrocknete Streifen können im bereitgestellten Berichts-/Auswertungsformular gesammelt werden. Die schützende Kunststoffflasche ist am Berichtsblatt dauerhaft an der linken Kante angebracht. Heben Sie die Kunststoffflasche sorgfältig von rechts nach links wie eine Buchseite ab. Platzieren Sie die reagierten Streifen auf den Klebestreifen im entsprechenden Schlitz und legen Sie die Kunststoffflasche wieder auf. Die schützende Kunststoffflasche ist wiederverwendbar für mehrere Sitzungen von Experimenten ausgelegt und die Streifen können in den entsprechenden Schlitten gesammelt werden. Der Techniker kann das Formular verwenden, um die Chargennummern von verwendeten Reagenzien, Probennummern und Ergebnissen/Kommentaren zu erfassen.

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Berichtsblattes

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolytierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie Proben bei 2-8 °C nicht länger als eine Woche. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

ANA Advanced LIA sollte nur als eine Hilfe zur Diagnose verwendet werden. Positive Ergebnisse können bei anderen autoimmunen Bedingungen oder bestimmten ansteckenden Krankheiten festgestellt werden. Deshalb sollten die Ergebnisse durch eine medizinische Behörde angesichts der Krankengeschichte des Patienten und anderer Laborbefunde bewertet und ausgewertet werden.

ERWARTETE WERTE

Bei 1:40 Titer können erhöhte Spiegel von antinukleären und zytoplasmatischen Antikörpern bei bis zu 30 % der Personen bei einer „normalen“ Population, wie bestimmt durch die IFA-Methodik, vorhanden sein. Bei einem Titer von 1:320 wurde berichtet, dass eine Positivitätsrate in normaler Population auf ungefähr 3 % absank. Die Häufigkeit der Autoantikörper-Positivität variiert in hohem Maße basierend auf den spezifischen Antigenen, Studien und der ausgewählten Gruppe von Proben. Die erwarteten Werte bei einer normalen Population sind bei LIA negativ. LIA-Assays sind dazu konzipiert, optimale Sensitivität und Spezifität zu bieten. Es wird empfohlen, das positive Ergebnis durch eine alternative Methodik zu bestätigen.

DE LEISTUNGSMERKMALE

Antigen-Spezifitäten

ANA Advanced LIA kann Autoantikörper zu den folgenden Antigenen erkennen: PM-Scl100, PM-Scl75, Ro-52, Ro-60, Jo-1, Ribo-P, Nukleosom, DNA, Histone, Sm, U1RNP68, U1RNP A, U1RNP C, SS-B/La, Scl-70, Cenp-B, PCNA, Mi-2, Ku, SRP-54 and AMA-M2 and DFS70 (LEDGF). Siehe Abbildung 2 zu individuellen Antigen- und Kontrolllinien-Positionen.

Kreuzreaktivität

Ein Panel potenziell kreuzreaktiver Autoimmunerkrankungsseren von Zuständen, die nicht mit ANA verbunden sind, wurde unter Verwendung von ANA Advanced LIA getestet. 1 aus 550 Bestimmungen demonstrierte eine positive Reaktion, die auf eine Spezifität von 99,8 % in dieser Population hinweist.

Interferenz

Interferenz wurde durch Mischen von Seren mit bekannten Spiegeln von Autoantikörpern für jeden Analyten mit sich potenziell gegenseitig beeinflussenden Serumproben und der Abweichung von erwarteten Resultaten studiert. Keine bedeutende Interferenz wurde für die folgenden Substanzen bei den angezeigten Spiegeln demonstriert: Hämoglobin (5 mg/ml), Bilirubin (0,4 Mg/ml), Rheumafaktor (entsprechend 200 EU) und Triglyceride (25 mg/ml). Die Interferenzstudien sind gemäß den CLSI-Richtlinien (Publikation EP7-A2) erfolgt.

Reproduzierbarkeit

Tests von Proben im negativen, zweideutigen und positiven Bereich wurden ausgeführt, um die qualitative Reproduzierbarkeit von Test zu Test und Ausführendem zu Ausführendem zu bestimmen. Die Ergebnisse produzierten 100 % qualitative Übereinstimmung.

LIA pour AAN avancé ImmcoStripe™

Ligne-immunoessai (LIA) pour la détection des anticorps antinucléaires

IVD

ENCART DE PRODUIT

RÉF 6011 Antinucléaire (AAN avancé) LIA pour anticorps 20 mesures

APPLICATION

Un ligne-immunoessai pour la détection et l'identification des anticorps aux antigènes nucléaires et cytoplasmiques associés aux maladies auto-immunitaires systémiques et spécifiques à certains organes.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les méthodes de laboratoire pour détecter les niveaux d'anticorps antinucléaires (AAN) dans le sang humain sont couramment utilisées pour aider au diagnostic des maladies des tissus conjonctifs y compris lupus érythémateux systémique (LES), la maladie de connectivité mixte (MCM), le syndrome de Sjögren et la sclérodermie.¹⁻⁵ Les AAN se retrouvent chez environ 95 % des patients souffrant de LES ainsi que chez les patients atteints de maladies de connectivité mixte. Les AAN peuvent aussi se retrouver dans d'autres désordres tels que les hépatites actives chroniques et les cirrhoses biliaires primaires.⁶⁻⁸

Les AAN ne sont pas spécifiques à des maladies ; toutefois, l'identification de spécificités particulières des AAN peut être utilisée pour supporter le diagnostic d'une maladie particulière ou un sous-ensemble d'une maladie. Les spécificités des AAN peuvent être déterminées par précipitation en gélose, hémagglutination, IFA, ELISA, Western-Blot et d'autres méthodes.

Les anticorps de l'Anti-U1 RNP sont caractéristiques chez les patients atteints de MCM. Les anticorps à l'antigène Sm se produisent uniquement dans les LES. Les anticorps SS-A (Ro) sont détectés dans le syndrome de Sjögren et les LES.¹ Les anticorps à Jo-1 (histidyl-ARNt-synthétase) se retrouvent chez les patients atteints d'une myosite.^{1,3} SS-B (La) est principalement rapporté dans les LES et le syndrome de Sjögren. Les anticorps à la fois au 52 kD SS-A (Ro) et au 48 kD SS-B (La) ont été retrouvés dans quasiment tous les patients souffrant de lupus érythémateux néonatal et de blocage cardiaque complet et la présence des deux dans les LES indique un autre âge d'apparition de la maladie et une fréquence plus basse de lupus néphrétique.⁹ Les anticorps Scl-70 réagissent aux topoisomérases humains et ils se retrouvent chez les patients atteints de sclérodermie diffuse. Les anticorps aux protéines associées au remodelage des antinucléosomes et à l'entretien du génome tels que respectivement Mi2 et Ku sont des indications des LES. Les autoanticorps contre les antigènes nucléaires ou cytoplasmiques dirigés contre les protéines ribonucléiques impliquées dans la synthèse des protéines (« antisynthétase ») telles que Jo1, PL-7, PL-12, EJ et OJ ou transport translationnel (SRP54) sont détectables dans environ un cinquième des patients atteints de polymyosite (PM) / dermatomyosite (DM). La liste LIA pour AAN avancé est capable de détecter les anticorps de la plupart des antigènes décrits ci-dessus ainsi que les AAM-M2, une cible principale des autoanticorps antimitochondriaux une caractéristique de la CBP (cirrhose biliaire primitive). Les anticorps anti-DFS70 ont été associés aux populations normales. La liste LIA pour AAN avancé ImmcoStripe™ est capable de simplifier la détection des auto-anticorps par rapport à 22 antigènes essentiels qui peuvent aussi être observés par dépistage IFA sur les substrats de cellule HEP-2. Les antigènes suivants sont immobilisés dans les buvards de test : PM-Scl100, PM-Scl75, SSA/Ro52, SSA/Ro60, Jo1, Ribo-P, Nucléosomes, ADN, Histones, Sm, U1SnRNP68, U1SnRNP A, U1SnRNP C, SSB/La, Scl70, CENP-B, PCNA, Mi2, Ku, SRP54, AMA-M2 et DFS70 (facteur de croissance dérivé de l'épithélium de la lentille). En plus des lignes d'antigènes, une ligne de démarcation, de sérum et de conjugué est fournie en bas du buvard.

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Pour effectuer un test, les bandes sont incubées avec le sang dilué du patient. Dans les sérums positifs, les anticorps se lient spécifiquement à une ou plusieurs lignes de test sur le buvard. Les buvards sont lavés conformément au protocole. Ensuite le conjugué pré-dilué prêt à l'emploi est ajouté aux buvards de test. Après

FR

l'incubation et les étapes de lavage, le substrat prêt-à-l'emploi est ajouté aux buvards. Pendant une incubation de 10 minutes, la liaison du conjugué et du substrat produit des lignes visibles bleues / violettes pour les lignes de contrôle de sérum, de conjugué et de démarcation. Si l'échantillon est positif pour le moindre antigène enduisant les lignes de test, il montrera une réaction plus intense que la ligne de démarcation. Les réactions sont lues visiblement et rapportées comme positives, négatives ou équivoques (par comparaison à la ligne de démarcation).

Matériaux fournis

LIA pour AAN avancé **RÉF** 6011

Les kits contiennent suffisamment de réactifs pour effectuer 20 mesures.

20 x **STRIP****ANA** Adv**LIA**

1 x 120 µl **CONTROL**+**ANA**

1 x 30 ml **CONJ****LIA**

1 x 30 ml **SUBSTRATE**

1 x 40 ml **SAMPLE****DIL**

1 x 50 ml **BUF****WASH****LIA**

2 x

1 x

Buvards de test de ligne-immunoessais, contenant des lignes de test enduites d'antigènes antinucléaires et des lignes de contrôle. Prêt à l'emploi.

Résolution positive (capuchon rouge). Contient du sang humain positif pour AAN.

Conjugué IgG.

Substrat enzymatique (bouteille ambrée). Prêt à l'emploi. **Protéger de la lumière.**

Diluant.

Tampon de lavage concentré. Reconstituer à un litre avec de l'eau déminéralisée ou distillée ou proportionnellement selon les besoins.

Plateaux d'essais de 10 puits LIA

Feuille d'annotation / de rapport

Symboles utilisés sur les étiquettes



Numéro de Lot



Numéro catalogue



Utilisation à diagnostic in vitro



A utiliser avant :



Température de stockage



Consulter les instructions d'emploi



Nombre de tests



Fabricant



Date de fabrication

Matériaux nécessaires, mais non fournis

- un cylindre gradué propre de 1000 ml
- des forceps non dentelés (forceps à filtre)
- un mélangeur ou secoueur à plateforme rotative
- du papier absorbant ou des serviettes en papier
- de l'eau déminéralisée ou distillée
- des pissettes en plastique pour contenir le tampon de lavage dilué ou l'eau déminéralisée
- des pipettes capables de délivrer de 10 à 1000 µl
- des têtes de pipettes jetables
- un compte-minutes

RÉACTIFS

Stockage et préparation

Stocker tous les réactifs entre 2 et 8 °C ; **ne pas congeler.**

Tous les réactifs doivent être ramenés à température ambiante (entre 18 et 25 °C) et être bien mélangés avant utilisation. Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité insoluble est présent. Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée lorsque stockés entre 2 et 8 °C et protégés de toute contamination ou comme énoncé ci-dessous après ouverture et/ou reconstitution.

FR

- Les buvards de test enduits d'antigènes [STRIP|ANA Adv|LIA] sont prêts à l'emploi. Veuillez laisser au sac contenant les buvards de test s'équilibrer à la température ambiante avant de l'ouvrir et d'éviter la condensation et la détérioration qui s'y associe. Veuillez remballer les buvards de test non utilisés et les stocker entre 2 et 8 °C dans un environnement obscur et sec.
- L'échantillon de dilution [SAMPLE|DIL] est prêt à l'emploi. Après ouverture, l'échantillon de dilution [SAMPLE|DIL] est stable pendant au moins 8 semaines lorsque correctement stocké et protégé de la contamination microbienne ou chimique.
- Reconstituez 1 volume de [BUF|WASH|LIA] dans 19 volumes d'eau distillée ou déminéralisée pour produire 1 litre de tampon de lavage. Le tampon de lavage est stable pendant au moins 8 semaines après la reconstitution lorsque correctement stocké et protégé de la contamination microbienne.
- Les [CONJ|LIA] et [SUBSTRATE] sont stables pendant au moins 8 semaines après l'ouverture lorsque correctement stocké et protégé de la contamination microbienne. Le [SUBSTRATE] est sensible à la lumière et il doit être stocké dans la bouteille de couleur ambrée fournie.

Les bandes d'antigènes ne peuvent être utilisées qu'une fois. Ne pas échanger les composants entre différents lots. Ne pas utiliser des réactifs au-delà de la date d'expiration indiquée sur les étiquettes.

Précautions

Toutes les composantes à dérivée humaine utilisées ont été testées pour HBsAg, HCV, HIV-1 et 2 et HTLV-I et tous les tests requis par la FDA sont revenus négatifs. Toutefois, les dérivés du sang humain et les échantillons des patients doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire en matière de stockage, de distribution et d'élimination des matériaux susmentionnés.¹⁰

AVERTISSEMENT : Proclin 300 est un conservateur. Lors de la mise au rebut des liquides contenant du Proclin 300, rincez avec de grands volumes d'eau pour diluer les composants en dessous des niveaux actifs.

Les instructions doivent être suivies à la lettre comme elles sont présentées dans l'encart du kit pour assurer des résultats valides. Ne pas échanger les composants du kit avec ceux d'autres sources. Respecter les bonnes pratiques de laboratoire pour minimiser la contamination microbienne et croisée des réactifs lors de la manipulation. Ne pas utiliser les composants du kit au-delà de la date d'expiration inscrite sur les étiquettes.

COLLECTE ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

Seuls les échantillons de sang doivent être utilisés dans cette procédure. Les échantillons avec une hémolyse grossière, des niveaux de lipides élevés ou une contamination microbienne peuvent interférer avec la réalisation du test et par conséquent ils ne doivent pas être utilisés. Stocker les spécimens entre 2 et 8 °C et pas plus d'une semaine. Pour un stockage plus long, les échantillons de sang doivent être congelés. Il est recommandé que les échantillons congelés soient testés dans l'année. Éviter les congélations et décongélations répétées des échantillons.

PROCÉDURE

Notes de procédure

- Lire l'encart du produit avec attention avant de commencer à faire l'essai.
- Laisser les échantillons de sang et les réactifs de test s'équilibrer à la température ambiante pendant environ 30 minutes avant de commencer la procédure de test. Remettre rapidement tous les échantillons et les réactifs non utilisés dans le réfrigérateur après utilisation.
- Une bonne technique de lavage est essentielle à la performance satisfaisante de l'essai.
- Ne manipuler les buvards de test qu'avec des forceps ou des gants propres. Éviter de toucher les zones blanches enduites d'antigènes.
- Les lignes de test sont placées au-dessus des lignes de démarcation, de résolution de sérum et de résolution du conjugué comme décrit dans le schéma (Figure 1). Les lignes de sérum et de résolution du conjugué apparaissent sur le même morceau de nitrocellulose en bas du buvard.
- Assigner des numéros d'identification des échantillons aux bandes respectives sur le formulaire de rapport. Chaque buvard possède un numéro de buvard et un numéro de lot imprimé au verso pour des raisons de traçabilité.
- Remplir toutes les informations pertinentes sur le formulaire de rapport avant de commencer l'essai.

Méthode de test

- Étape 1** À l'aide de gants ou de forceps émousés, décoller le nombre de buvards nécessaires. Faire bien attention de ne pas toucher les zones enduites d'antigènes avec les mains nues ou des forceps pointus.
- Étape 2** Mettre le nombre requis de **STRIP|ANA Adv|LIA** étiquetés vers le haut dans les puits individuels du plateau à essai.
- Étape 3** Verser 1,5 ml **SAMPLE|DIL** dans chaque puits ; s'assurer que les buvards sont complètement submergés dans le liquide.
- Étape 4** Incuber les buvards dans **SAMPLE|DIL** pendant au moins 10 minutes sur un mélangeur. La couleur bleue dans les emplacements enduits d'antigènes et de résolution commence à disparaître au fur et à mesure que la membrane s'imbibe de liquide.
- Étape 5** Verser 15 µl d'échantillon sanguin ou de résolution positive dans les puits appropriés afin d'obtenir une dilution 1:101. Incuber pendant 60 minutes (±5 min) à température ambiante sur un mélangeur ou un secoueur tournant.
- Étape 6** **LAVAGE** : Aspirer la solution d'échantillon dans un bac à déchets. Nettoyer soigneusement les buvards avec le tampon de lavage **reconstitué** en faisant gicler environ 2 ml de solution directement sur les bandes. Laver les bandes avec une légère agitation pendant 5 minutes et aspirer la solution dans un bac à déchets. Répéter le lavage deux fois de plus.
- Précaution : Compléter le lavage des bandes entre les incubations est crucial à l'obtention des résultats valides. Un lavage incorrect entraînera une coloration élevée de l'arrière-plan. Ne pas laisser les buvards se sécher à n'importe quelle étape pendant l'analyse.
- Étape 7** Verser 1,0 ml de **CONJ|LIA** dans chaque puits. Incuber 30 minutes (±5 min) à température ambiante sur un mélangeur ou un secoueur tournant.
- Étape 8** Répéter l'étape 6.
- Étape 9** Verser 1,0 ml à la pipette de **SUBSTRATE|TMB** dans chaque puits et incuber en remuant légèrement pendant 10 minutes à température ambiante et à lumière réduite. Les lignes de sérum et de résolution du conjugué développent une couleur intense après l'incubation dans le substrat. La ligne de démarcation de la résolution se développe en une ligne invisible en une ligne légèrement colorée après l'incubation.
- Étape 10** Pour arrêter la réaction, rincer les buvards 2x avec de l'eau distillée ou déminéralisée en faisant gicler environ 2 ml d'eau directement sur les buvards suivie d'une aspiration. Ne pas faire tremper/laver pendant plus de 10 minutes, car ceci peut entraîner la réduction de la sensibilité des lignes colorées développées.
- Étape 11** À l'aide de forceps émousés, retirer les buvards du plateau à essai et les mettre délicatement sur du papier absorbant et les laisser sécher. Laisser les buvards sécher avant de les analyser ou de les coller sur la feuille d'annotation / de rapport.

Contrôle de la qualité

Contrôles de protocole : Chaque buvard possède trois contrôles de protocole pour l'addition de sérum et de conjugué et une ligne de démarcation pour déterminer les réactions faibles ou négatives.

Les résolutions positives et négatives sont disponibles comme composants en option et elles peuvent être utilisées comme contrôle de la qualité supplémentaire.

Il est attendu que les laboratoires individuels optimisent le temps de développement du substrat de ±4 minutes en fonction du processeur de blots ou de la méthodologie manuelle. Il est recommandé que la ligne de démarcation soit légèrement visible à l'œil, après incubation avec le substrat.

Interprétation

Les buvards de test contiennent des lignes de résolution en bas et une ligne de test au-dessus des résolutions. L'extrémité inférieure du buvard test (près du numéro de série) possède trois lignes de résolution : la ligne de démarcation, la ligne de résolution du sérum et la ligne de résolution du conjugué de haut en bas. La démarcation permet au technicien de déterminer le résultat du test en tant que positif, négatif ou indéterminé (+/-). Les deux lignes de résolution de protocole assurent que l'addition d'un échantillon, d'un conjugué et d'un substrat.

Comparer la réaction des lignes de test avec celles des résolutions. L'utilisation d'une loupe peut aider à observer les réactions faibles.

- Comme marqué dans la Figure 1, les lignes de résolution du sérum et du conjugué doivent être clairement positives indiquant une expérience réussie. La démarcation est une ligne légère avec variation en intensité en fonction des conditions de l'expérience. Le schéma de la Figure 1 montre un exemple d'une ligne de test. Dans le LIA AAN avancé (Figure 2), il existe 22 lignes de test et 3 lignes de résolution. Le développement de la ligne de test dépend de l'échantillon. Les réactions positives peuvent se produire dans diverses intensités allant de faibles à fortes. **Les réactions faibles doivent être comparées avec l'intensité de la ligne de démarcation fournie sur le buvard.** Les réactions qui sont distinctement plus foncées ou plus denses que l'intensité de la ligne de démarcation doivent être considérées positives.
- Les buvards peuvent présenter un arrière-plan homogène ou décoloré en raison de divers facteurs d'interférence dans le sérum lipémique ou hémolytique. Cet effet peut aussi être vu si les buvards de test ne sont pas suffisamment bloqués ou si par accident ils ont séché pendant l'analyse.
- En cas de réactions positives ou négatives faibles, l'intensité de la ligne réagissante doit être comparée à la ligne de démarcation pour déterminer le résultat comme négatif (plus faible que l'intensité de la ligne de démarcation) ou équivoque (+/- ; indistinguable de la ligne de démarcation). La visualisation des réactions faibles est améliorée lorsque les buvards sont complètement secs. Les échantillons équivoques doivent être confirmés par une autre méthode.
- Les buvards séchés peuvent être rassemblés sur la feuille d'annotation / de rapport fournie. La languette plastique de protection est fixée de manière permanente sur le bord gauche de la feuille de rapport. Soulevez avec précaution la languette plastique de la droite vers la gauche comme la page d'un livre. Mettez les buvards ayant réagi sur la bande adhésive dans l'emplacement respectif et remettez la languette en plastique à sa place. La languette de protection en plastique est conçue pour être réutilisable pour plusieurs sessions d'expérience et les buvards peuvent être réunis dans leurs emplacements prévus à cet effet. Le technicien peut utiliser le formulaire pour enregistrer les numéros de lot de réactifs utilisés, le nombre d'échantillons et les résultats / commentaires.

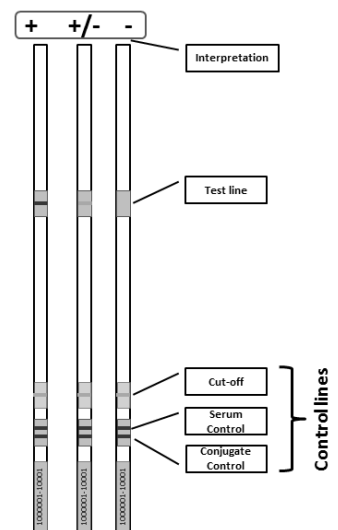


Figure 1 : Schéma de buvards LIA ayant réagi avec une ligne de test.

Figure 2 : Schéma de la feuille de rapport

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Seuls les échantillons de sang doivent être utilisés dans cette procédure. Les spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou contaminés par des microbes peuvent interférer avec la performance du test et ils ne doivent pas être utilisés. Ne pas stocker les échantillon entre 2 et 8 °C plus d'une semaine. Pour un stockage plus long, les échantillons de sang doivent être congelés. Éviter les congélations et décongélations répétées des échantillons.

Le LIA pour AAN avancé ne doit être utilisé que comme aide au diagnostic. Les résultats positifs peuvent être trouvés dans d'autres conditions autoimmunes ou certaines maladies infectieuses. Ainsi les résultats doivent être évalués et interprétés par une autorité médicale en fonction de l'historique clinique du patient et des autres résultats de laboratoire.

VALEURS ATTENDUES

À un titre à 1:40, des niveaux élevés d'anticorps antinucléaires et cytoplasmiques peuvent être présents dans jusqu'à 30 % des individus dans une population « normale » comme déterminé par la méthodologie IFA. À un titre à 1:320, le taux de positivité dans la population normale a été rapporté descendre à approximativement 3 %. L'incidence de la positivité aux auto-anticorps varie grandement en fonction des antigènes spécifiques, des études et de la cohorte d'échantillons sélectionnée. Les valeurs attendues dans une population normale sont négatives sur le LIA. Les listes LIA sont conçues pour fournir une sensibilité et une spécificité optimales. Il est recommandé de confirmer les résultats positifs avec une autre méthodologie.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Spécificités des antigènes

Le LIA pour AAN avancé est capable de détecter les auto-anticorps des antigènes suivants : PM-Scl100, PM-Scl75, SSA/Ro52, SSA/Ro60, Jo1, Ribo-P, Nucléosomes, ADN, Histones, Sm, U1SnRNP68, U1SnRNP A, U1SnRNP C, SSB/La, Scl70, CENP-B, PCNA, Mi2, Ku, SRP54, AMA-M2 et DFS70 (facteur de croissance dérivé de l'épithélium de la lentille). Se reporter à la Figure 2 pour la position des lignes de résolution et des antigènes individuels.

Réactivité croisée

Une liste d'échantillons sanguins de maladies auto-immunitaires à réactivité croisée potentielle de conditions non associées à AAN a été testée en utilisant le test LIA pour AAN avancé. 1 mesure sur 550 a démontré une réaction positive indiquant une spécificité de 99,8 % dans cette population.

Interférence

L'interférence a été étudiée en mélangeant des sérums sanguins avec des niveaux d'auto-anticorps anti-gliadine connus pour chaque substance à analyser avec des échantillons de sérum interférant potentiellement et en étudiant la déviation par rapport aux résultats attendus. Aucune interférence importante n'a été démontrée pour les substances suivantes aux niveaux indiqués : Hémoglobine (5 mg/ml), Bilirubine (0,4 mg/ml), facteur rhumatoïde (200 EU équivalent) et triglycérides (25 mg/ml). Les études d'interférence ont été effectuées en fonction des directives du CLSI (publication EP7-A2).

Reproductibilité

Des analyses d'échantillons dans la gamme négative, équivoque et positive ont été effectuées afin de déterminer la reproductibilité qualitative d'un test à un autre et d'un opérateur à un autre. Les résultats ont produit un accord qualitatif à 100 %.

ImmcoStripe™ ANA Advanced LIA

Immunodosaggio a linee (LIA) per il rilevamento di anticorpi anti nucleo

IVD

FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

REF 6011 Anticorpo anti nucleo LIA (ANA-Advanced) 20 determinazioni

USO PREVISTO

Un immunodosaggio a linee per il rilevamento e l'identificazione di anticorpi ad antigeni nucleari e citoplasmatici associati a malattie autoimmuni sistemiche e specifiche di alcuni organi.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

I metodi di laboratorio per rilevare i livelli di anticorpi anti nucleo (ANA) in siero sono comunemente usati come aiuto nella diagnosi di disordini del tessuto connettivo come il lupus eritematoso sistemico (SLE), malattia del tessuto connettivo misto (MCTD), sindrome di Sjögren e sclerodermia.¹⁻⁵ Gli ANA si presentano di circa il 95% di pazienti SLE e in pazienti con altre malattie del tessuto connettivo. Gli ANA possono anche presentarsi in altri disordini come epatiti attive croniche e cirrosi biliare primitiva.⁶⁻⁸

Gli ANA non sono specifici della malattia; tuttavia, l'identificazione di particolari specificità degli ANA può essere usata per supportare la diagnosi di una particolare malattia o di un sottoinsieme di malattie. Le specificità degli ANA possono essere determinate da precipitazione in gel, emoagglutinazione, IFA, ELISA, Western Blot e altri metodi.

Gli anticorpi a U-1 RNP sono caratteristici dei pazienti con MCTD. Gli anticorpi a antigene Sm si presentano unicamente in SLE. Gli anticorpi SS-A (Ro) sono rilevati nella sindrome di Sjögren e SLE.¹ Gli anticorpi Jo-1 (istidil-tRNA sintetasi) si presentano in pazienti con mirositide.^{1,3} SS-B (La) è riportata principalmente nella SLE e nella sindrome di Sjögren. Gli anticorpi anti 52 kD SS-A (Ro) e 48 kD SS-B (La) sono presenti virtualmente in tutti i pazienti con lupus eritematoso neonatale e blocco cardiaco completo, e la presenza di entrambi in SLE indica un'età successiva dell'inizio della malattia e una frequenza inferiore di nefrite lupica.⁹ Gli anticorpi Scl-70 reagiscono con topoisomerasi umana e sono presenti in pazienti con sclerodermia diffusa. Gli anticorpi anti rimodellamento del nucleosoma e proteine associate al mantenimento del genoma come Mi2 e Ku sono rispettivamente un'indicazione di SLE. Gli autoanticorpi anti antigeni nucleari o citoplasmatici diretti contro ribonucleoproteine coinvolte nella sintesi proteica ("anti-sintetasi") come Jo1, PL-7, PL-12, EJ e OJ o trasporto transazionale (SRP54) sono rilevabili in circa un quinto di pazienti con polimiosite (PM) / dermatomiosite (DM). Il pannello ANA Advanced LIA è capace di rilevare anticorpi alla maggior parte di antigeni descritti come AMA-M2, un target maggiore di anticorpi anti mitocondrio, una caratteristica di PBC (cirrosi biliare primitiva). Gli anticorpi anti-DFS70 sono stati associati alla popolazione normale. Il pannello ImmcoStripe™ ANA-Advanced LIA è capace di semplificare il rilevamento di autoanticorpi contro 22 antigeni principali che possono essere osservati anche dallo screening IFA su substrati di cellule HEP-2. I seguenti antigeni sono immobilizzati sulle strisce del test: PM-Scl100, PM-Scl75, SSA/Ro52, SSA/Ro60, Jo1, Ribo-P, nucleosomi, DNA, istoni, Sm, U1SnRNP68, U1SnRNP A, U1SnRNP C, SSB/La, Scl70, CENP-B, PCNA, Mi2, Ku, SRP54, AMA-M2 e DFS70 (LEDGF). Oltre alle linee di antigeni, alla base della striscia viene fornita una linea di controllo di cut-off, siero e coniugato.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Per eseguire il test le strisce sono incubate con il siero paziente diluito. Nel siero positivo gli anticorpi si collegano specificamente ad uno o più linee di test sulla striscia. Le strisce sono lavate secondo il protocollo, poi pre-diluite e il coniugato pronto per l'uso è aggiunto alle strisce per test. Dopo l'incubazione e il lavaggio delle strisce, il substrato pronto per l'uso è aggiunto alle strisce. Durante un'incubazione di 10 minuti, il legame di coniugato e substrato produce linee blu/viola visibili per le linee di controllo di siero, coniugato e cut-off. Se il campione è positivo per qualsiasi linea di test rivestita di antigeni, questa mostrerà una reazione più intensa

IT

della linea di cut-off. Le reazioni sono lette visivamente e riportate come positive, negative o equivoche (confrontabili con la linea di cut-off).

Materiale fornito

ANA Advanced LIA **REF** 6011

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 20 determinazioni.

20 x **STRIP**|**ANA Adv**|**LIA**

Strisce per test per immunodosaggio a linee, contenente linee di test rivestite con antigene antinucleare e linee di controllo. Pronto per l'uso.

1 x 120 µl **CONTROL**|**+**|**ANA**

Controllo positivo (tappo rosso). Contiene siero umano positivo per ANA.

1 x 30 ml **CONJ**|**LIA**

Coniugato IgG.

1 x 30 ml **SUBSTRATE**

Substrato enzimatico (bottiglia ambrata). Pronto per l'uso. **Proteggere dalla luce.**

1 x 40 ml **SAMPLE**|**DIL**

Diluente

1 x 50 ml **BUF**|**WASH**|**LIA**

Tampone di lavaggio concentrato. Ricostituire a un litro con acqua deionizzata o distillata o proporzionalmente come necessario.

2 x

LIA 10 vassoi per dosaggio pozzetti

1 x

Report/scheda di valutazione

Simboli usati sulle etichette



Codice del lotto



Numero di catalogo



Per uso diagnostico *in vitro*



Utilizzare entro



Temperatura di conservazione



Consultare le istruzioni per l'uso



Numero di test



Fabbricante



Data di fabbricazione

Materiali necessari ma non forniti

- Cilindro graduato 1000 ml trasparente
- Forcipe non dentato (forcipe filtro)
- Bilanciere o dispositivo vibrante di piattaforma girevole
- Carta assorbente o salviette di carta
- Acqua deionizzata o distillata
- Boccette comprimibili per contenere il tampone di lavaggio diluito o acqua distillata
- Pipette con capacità di erogazione da 10 µl a 1000 µl
- Puntali monouso per pipette
- Contaminuti

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C; **non congelare.**

Tutti i reagenti devono essere tenuti a temperatura ambiente (18-25°C) e miscelati bene prima dell'uso. Non utilizzare se il reagente non è limpido o in presenza di un precipitato non solubile. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati a 2-8°C e protetti contro contaminazione, o come indicato di seguito dopo l'apertura e/o aggiunta.

- Le strisce per test rivestite con antigene **STRIP**|**ANA Adv**|**LIA** sono pronte per l'uso. Prima dell'apertura, attendere che la busta di strisce per test raggiunga l'equilibrio a temperatura ambiente al fine di evitare la formazione di condensa e deterioramento. Richiudere le strisce per test non utilizzate e conservarle a 2-8°C al buio e in un ambiente asciutto.

IT

- Il diluente campione [SAMPLE DIL] è pronto per l'uso. Dopo l'apertura, il diluente campione [SAMPLE DIL] è stabile per almeno 8 settimane se conservato correttamente e protetto da contaminazione microbica o chimica.
- Ricostituire 1 parte [BUF WASH LIA] in 19 parti di acqua distillata o deionizzata per avere 1 litro di tampone di lavaggio. Il tampone di lavaggio è stabile per almeno 8 settimane dopo l'aggiunta di liquidi se conservato correttamente e protetto da contaminazione microbica.
- [CONJ LIA] e [SUBSTRATE] sono stabili per almeno 8 settimane dopo l'apertura se conservati correttamente e protetti da contaminazione microbica. [SUBSTRATE] è sensibile alla luce e deve essere conservato nella bottiglia ambrata fornita.

Le strisce di antigeni sono monouso. Non scambiare componenti di tipi diversi. Non usare reagenti oltre la data di scadenza indicata sulle etichette.

Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana utilizzati sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 e HTLV-I e sono risultati negativi in base ai test richiesti dalla FDA. Gli emoderivati umani e i campioni dei pazienti vanno tuttavia considerati potenzialmente infettivi. Seguire le buone pratiche di laboratorio durante la conservazione, la preparazione, la distribuzione e lo smaltimento di questi materiali.¹⁰

AVVERTENZA – Proclin 300 è un conservante. Dopo lo smaltimento di liquidi contenenti Proclin 300, lavare con abbondante acqua per diluire i componenti al di sotto dei livelli attivi.

Per ottenere risultati validi, le istruzioni devono essere osservate esattamente come compaiono in questo foglietto del kit. Non scambiare i componenti del kit con quelli di altre fonti. Seguire le buone pratiche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti. Non usare i componenti del kit oltre la data di scadenza indicata sulle etichette.

PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

In questa procedura utilizzare solo campioni di siero. I campioni con emolisi grave, lipidi elevati o contaminazione microbica possono interferire con la prestazione del test e quindi non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a 2° - 8°C per una settimana al massimo. Per conservazioni più prolungate, congelare i campioni di siero. Si consiglia di testare campioni congelati entro un anno. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni.

PROCEDURA

Note sulla procedura

- Prima di iniziare il dosaggio, leggere attentamente il foglio illustrativo del prodotto.
- Prima di avviare la procedura del test, attendere che i campioni di siero e i reagenti del test raggiungano l'equilibrio a temperatura ambiente per ca. 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso, rimettere in frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
- È fondamentale una tecnica di lavaggio valida per un risultato soddisfacente del dosaggio.
- Manipolare le strisce del test solo con il forcipe o guanti. Non toccare le zone ricoperte da antigeni bianchi.
- Le linee per test sono messe sopra le linee di controllo di cut-off, siero e coniugato come descritte nello schema (Fig. 1). Le linee di controllo siero e coniugato compaiono sullo stesso posto di nitrocellulosa sul fondo della striscia.
- Assegnare i numeri di identificazione dei campioni alle rispettive strisce sul report. Ogni striscia presenta il numero di striscia e il numero di lotto stampato sul fondo per rintracciabilità.
- Inserire tutte le informazioni importanti sul report prima di iniziare il dosaggio.

Metodo del test

Passaggio 1 Con dei guanti o un forcipe smussato aprire il numero necessario di strisce. Far attenzione a non toccare le zone rivestite con antigeni a mani nude o con un forcipe appuntito.

Passaggio 2 Mettere il numero necessario di [STRIP ANA Adv LIA] etichettate rivolte verso l'alto nei singoli pozzetti del vassoio di dosaggio.

- Passaggio 3** Pipettare 1,5 ml di [SAMPLE|DIL] in ogni pozzetto verificando che le strisce siano completamente nel liquido.
- Passaggio 4** Incubare le strisce in [SAMPLE|DIL] per almeno 10 minuti. Il colore blu in posizioni rivestite di antigene e di controllo inizia a scomparire mentre la membrana viene assorbita.
- Passaggio 5** Pipettare 15 µl di campione di siero o di controllo positivo nei pozzetti appropriati per ottenere una miscela di 1:101. Incubare per 60 minuti (±5 min.) a temperatura ambiente su un bilanciere o dispositivo vibrante.
- Passaggio 6** LAVAGGIO: Aspirare la soluzione campione nel contenitore rifiuti. Lavare per bene le strisce con un tampone di lavaggio **ricostituito** spruzzando circa 2 ml di soluzione direttamente sulle strisce. Lavare le strisce agitando con cura per 5 minuti e aspirare la soluzione nel contenitore per rifiuti. Ripetere il lavaggio altre due volte.
Attenzione: È fondamentale una tecnica di lavaggio completa per ottenere risultati validi. Un lavaggio improprio determina la colorazione del fondo. Far attenzione a non far asciugare le strisce in nessun momento durante il dosaggio.
- Passaggio 7** Pipettare 1,0 ml di [CONJ|LIA] in ogni pozzetto. Incubare per 30 minuti (±5 min.) a temperatura ambiente su un bilanciere o dispositivo vibrante.
- Passaggio 8** Ripetere il passaggio 6.
- Passaggio 9** Pipettare 1,0 ml di [SUBSTRATE|TMB] in ogni micropozzetto e incubare agitando con cura per 10 minuti (±5 min) a temperatura ambiente e luce soffusa. Le linee di controllo di siero e coniugato sviluppano un colore intenso dopo l'incubazione nel substrato. La linea di controllo di cut-off sviluppa una linea da bianca a lievemente colorata dopo l'incubazione.
- Passaggio 10** Per interrompere la reazione, sciacquare 2 strisce con acqua distillata/deionizzata spruzzando circa 2 ml di acqua direttamente sulle strisce e poi aspirare. Non immergere/lavare per più di 10 minuti in quanto si rischia di ridurre la sensibilità delle linee colorate sviluppate.
- Passaggio 11** Con un forcipe smussato togliere le strisce dal vassoio di dosaggio, metterle con cura su della carta assorbente e attendere che si asciughino. Far asciugare le strisce prima di analizzarle e porle sul report/scheda di valutazione.

Controllo di qualità

Controlli procedurali: Ogni striscia presenta tre controlli procedurali per l'aggiunta del siero e del coniugato e di una linea di cut-off al fine di determinare le reazioni deboli o negative.

I controlli positivi e negativi sono disponibili come componenti opzionali e possono essere eseguiti per un altro controllo di qualità.

I singoli laboratori devono ottimizzare il tempo di sviluppo del substrato di +/- 4 minuti in base al processore di blot o ai metodi manuali. Si consiglia che la linea di cut-off debba una linea lievemente visibile dopo le incubazioni con substrato.

Interpretazione

Le strisce per test contengono linee di controllo sul fondo e una linea di test sopra i controlli. L'estremità inferiore della striscia per test (vicino al numero seriale) presenta tre linee di controllo: la linea di cut-off, la linea di controllo siero e la linea di controllo coniugato dall'alto verso il basso. Il cut-off consente al tecnico di determinare il risultato del test come positivo, negativo o indeterminato (+/-). Le due linee di controllo procedura garantiscono l'aggiunta di campione, coniugato e substrato.

Confrontare la reazione delle linee del test con quelle dei controlli. Usare una lente di ingrandimento per osservare meglio le reazioni deboli.

- Come etichettato in Figura 1, le linee di controllo di siero e coniugato devono essere chiaramente positive per indicare un esperimento di successo. Il cut-off è una linea debole con variazione in intensità in base alle condizioni sperimentali. Lo schema della Figura 1 mostra un esempio della linea di test. Nell'ANA Advanced LIA (Figura 2) ci sono 22 linee di test e 3 linee di controllo. Lo sviluppo della linea di test dipende dal campione. Le reazioni positive possono verificarsi in intensità variabili da debole a forte. **Le reazioni deboli devono essere confrontate con l'intensità della linea di cut-off fornita nella**

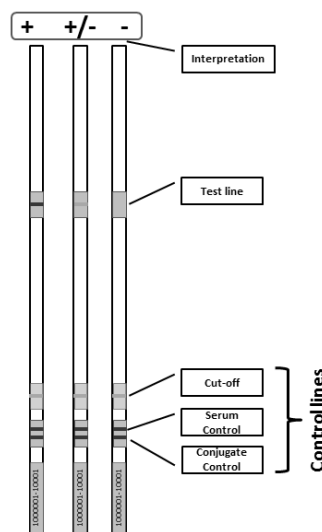


Figura 1: Schema delle strisce LIA dopo

striscia. Le reazioni che sono notevolmente più scure o più dense rispetto alla densità della linea di cut-off devono essere considerate positive.

- Le strisce possono mostrare uno sfondo omogeneo o scolorito a causa di diversi fattori che interferiscono nel siero lipemico o emolitico. Questo effetto può essere visto anche se le strisce per test non sono sufficientemente bloccate o se dovesse capitare che si asciugano durante il dosaggio.
- Nel caso di reazioni deboli positive e negative, l'intensità della linea che reagisce deve essere confrontata con la linea di cut-off per rilevare il risultato negativo (intensità più debole rispetto alla linea di cut-off) o incerto (+/-, indistinguibile dalla linea di cut-off). La visualizzazione di reazioni deboli è migliorata quando le strisce sono completamente asciutte. I campioni equivoci devono essere confermati da un metodo alternativo.
- Le strisce asciutte possono essere messe assieme nel report/foglio di valutazione. La linguetta protettiva in plastica è applicata in modo permanente al report sul bordo sinistro. Tirare con cura la linguetta protettiva in direzione da destra a sinistra come la pagina di un libro. Mettere le strisce che hanno reagito sul nastro adesivo nella rispettiva fessura e coprirle con la linguetta in plastica e rimetterle a posto. La linguetta in plastica protettiva è progettata per essere riutilizzata per diverse sessioni di esperimenti e le strisce possono essere messe assieme nelle rispettive fessure. Il tecnico può usare il modello per registrare i numeri del lotto di reagenti usati, il numero di campioni e i risultati/commenti.

Figura 2: Schema del report

LIMITI DELLA PROCEDURA

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

L'ANA Advanced LIA deve essere usato solo come supporto alla diagnosi. I risultati positivi possono essere trovati in altre condizioni autoimmuni o alcune malattie infettive. I risultati devono essere valutati e interpretati da un ente sanitario alla luce della storia clinica del paziente e delle altre scoperte di laboratorio.

VALORI PREVISTI

Ad un titolo di 1:40, i livelli elevati di anticorpi anti nucleo e citoplasmatici possono essere presenti in un massimo di 30% di individui in una popolazione "normale" come determinato dalla metodologia IFA. Ad un titolo di 1:320 il tasso di positività nella popolazione normale sembra sceso a circa il 3%. L'incidenza della positività di autoanticorpi varia in gran parte in base ad antigeni specifici, studi e determinate serie di campioni. I valori previsti in una popolazione normale sono negativi su LIA. I pannelli LIA sono destinati a fornire ottima sensibilità e specificità. Si consiglia di confermare il risultato positivo da una metodologia alternativa.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Specificità antigeni

L'ANA Advanced LIA è capace di rilevare autoanticorpi ai seguenti antigeni: PM-Scl100, PM-Scl75, Ro-52, Ro-60, Jo-1, Ribo-P, nucleosomi, DNA, istoni, Sm, U1RNP68, U1RNP A, U1RNP C, SS-B/La, Scl-70, Cenp-B, PCNA, Mi-2, Ku, SRP-54 e AMA-M2 e DFS70 (LEDGF). Far riferimento alla Figura 2 per le posizioni della linea di antigene singolo e di controllo.

Reattività crociata

Un pannello di siero per malattia potenzialmente autoimmune con reattività incrociata da condizioni non associate all'ANA è stato testato mediante il test ANA-Advanced LIA. 1 determinazione su 550 ha dimostrato una reazione positiva che indica una specificità del 99,8% in questa popolazione.

IT

Interferenza

L'interferenza è stata studiata mescolando siero con livelli noti di anticorpi per ogni analita con campioni di siero potenzialmente interferenti e studiando la deviazione dai risultati previsti. Non è stata dimostrata un'interferenza significativa per le seguenti sostanze ai livelli indicati: emoglobina (5 mg/ml), bilirubina (0,4 mg/ml), fattore reumatoide (200 EU equivalente) e trigliceridi (25 mg/ml). Sono stati eseguiti studi sull'interferenza secondo le linee guida CLSI (pubblicazione EP7-A2).

Riproducibilità

I dosaggi di campioni nell'intervallo negativo, incerto e nell'intervallo positivo sono stati eseguiti per determinare la riproducibilità qualitativa da sessione a sessione e da operatore a operatore. I risultati hanno prodotto una concordanza qualitativa del 100%.



ImmcoStripe™ ANA Advanced LIA

Imunoensaio de linha (LIA) para a detecção de anticorpos antinucleares

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 6011	Anticorpos antinucleares LIA (ANA-Advanced)	20 Determinações
-----------------	--	------------------

APLICAÇÃO

Um imunoensaio de linha para a detecção e identificação de anticorpos contra antígenos nucleares e citoplasmáticos associados a doenças sistêmicas e determinadas doenças autoimunes de órgãos específicos.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os métodos laboratoriais para detetar níveis de anticorpos antinucleares (ANA) em soro são comumente utilizados para auxílio no diagnóstico de distúrbios do tecido conjuntivo, incluindo lúpus eritematoso sistémico (LES), doença mista do tecido conjuntivo (DMTC), síndrome de Sjögren e esclerodermia.¹⁻⁵ Os ANA ocorrem em cerca de 95% de pacientes com LES, bem como em pacientes com outras doenças do tecido conjuntivo. Os ANA podem igualmente ocorrer noutros distúrbios, como a hepatite ativa crónica e a cirrose biliar primária.⁶⁻⁸

Os ANA não são específicos da doença; no entanto, a identificação de especificidades particulares dos ANA pode ser utilizada para apoiar o diagnóstico de uma determinada doença ou subconjunto de doenças. As especificidades dos ANA podem ser determinadas através de precipitação em gel, hemaglutinação, IFA, ELISA, western blot e outros métodos.

Os anticorpos anti-U-1 RNP são característicos dos pacientes com DMTC. Os anticorpos contra o antígeno Sm ocorrem exclusivamente no LES. Os anticorpos anti-SS-A (Ro) são detetados na Síndrome de Sjögren e no LES.¹ Os anticorpos anti-Jo-1 (histidil-tRNA sintetase) ocorrem em pacientes com miosite.^{1,3} O SS-B (La) é principalmente reportado no LES e na Síndrome de Sjögren. Os anticorpos anti-52 kD SS-A (Ro) e 48 kD SS-B (La) são encontrados em praticamente todos os pacientes com lúpus eritematoso sistémico neonatal e bloqueio atrioventricular total, e a presença de ambos no LES indica uma manifestação da doença numa idade posterior e uma frequência menor de nefrite lúpica.⁹ Os anticorpos anti-Scl-70 reagem com a topoisomerase humana e são encontrados em pacientes com esclerodermia difusa. Os anticorpos contra a remodelação de nucleossomo e as proteínas associadas à manutenção do genoma, como a Mi2 e a Ku, respetivamente, constituem uma indicação de LES. Os autoanticorpos contra antígenos nucleares ou citoplasmáticos direcionados contra ribonucleoproteínas envolvidas na síntese proteica ("anti-sintetases") como Jo1, PL-7, PL-12, EJ e OJ ou transporte translacional (SRP54) são detetáveis em cerca de um quinto dos pacientes com poliomiosite (PM)/dermatomiosite (DM). O painel ANA Advanced LIA é capaz de detetar anticorpos contra a maioria dos antígenos acima descritos, bem como o AMA-M2, um objetivo importante dos autoanticorpos mitocondriais, uma característica da CBP (cirrose biliar primária). Os anticorpos anti-DFS70 foram associados à população normal. O painel ImmcoStripe™ ANA-Advanced LIA é capaz de simplificar a detecção de autoanticorpos contra 22 antígenos-chave que podem ser igualmente observados através de rastreio por IFA sobre substratos de células HEp-2. São imobilizados nas tiras de teste os antígenos seguintes: PM-Scl100, PM-Scl75, SSA/Ro52, SSA/Ro60, Jo1, Ribo-P, Nucleossomas, ADN, Histonas, Sm, U1SnRNP68, U1SnRNP A, U1SnRNP C, SSB/La, Scl70, CENP-B, PCNA, Mi2, Ku, SRP54, AMA-M2 e DFS70 (LEDGF). Para além das linhas de antígenos, é fornecida na parte inferior da tira uma linha de controlo de corte, soro e conjugado.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Para executar o teste, as tiras são incubadas com soro de paciente diluído. No soro positivo, os anticorpos ligam-se especificamente a uma ou mais das linhas de teste na tira. As tiras são lavadas de acordo com o protocolo e, posteriormente, o conjugado pré-diluído e pronto a utilizar é adicionado às tiras de teste. Após as etapas de incubação e lavagem, o substrato pronto a utilizar é adicionado às tiras. Durante uma incubação de 10 minutos, a fixação do conjugado e do substrato produz linhas visíveis azuis/roxas para as linhas de controlo

PT

do soro, conjugado e corte. Se a amostra for positiva para qualquer uma das linhas de teste revestidas com antígeno, tal vai apresentar uma reação mais intensa do que a linha de corte. As reações são lidas visualmente e comunicadas como positivas, negativas ou não conclusivas (comparáveis com a linha de corte).

Materiais fornecidos

ANA Advanced LIA **REF** 6011

Os kits contêm reagentes suficientes para executar 20 determinações.

20 x **STRIP**|**ANA Adv**|**LIA**

Tiras de Teste do Imunoensaio de Linha, contendo linhas de teste revestidas de antígeno antinuclear e linhas de controlo. Prontas a utilizar.

1 x 120 µl **CONTROL**|**+**|**ANA**

Controlo Positivo (tampa vermelha). Contém soro humano positivo para ANA.

1 x 30 ml **CONJ**|**LIA**

Conjugado IgG.

1 x 30 ml **SUBSTRATE**

Substrato enzimático (garrafa âmbar). Pronto a utilizar. **Proteger da luz.**

1 x 40 ml **SAMPLE**|**DIL**

Diluyente

1 x 50 ml **BUF**|**WASH**|**LIA**

Tampão de lavagem concentrado. Reconstituir para um litro com água desionizada ou destilada, ou proporcionalmente, consoante o necessário.

2 x

Bandejas de ensaio 10 poços LIA

1 x

Folha de Relatório/Pontuação

Símbolos utilizados nos rótulos



Número de lote



Número de catálogo



Utilização diagnóstica *in vitro*



Utilização por



Temperatura de armazenamento



Consulte as instruções de utilização



Número de testes



Fabricante



Data de fabricação

Material exigido mas não fornecido

- Proveta cilíndrica graduada e limpa de 1000 ml.
- Pinças não dentadas (Pinças para Filtros)
- Agitador ou vibrador de plataforma rotativa
- Papel absorvente ou toalhetes de papel
- Água desionizada ou destilada
- Garrafa de plástico para conter o tampão de lavagem diluído ou a água destilada
- Pipetas com capacidade de libertação de 10 a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Temporizador

REAGENTES

Conservação e Preparação

Armazenar todos os reagentes a uma temperatura entre 2 a 8°C; **não congelar.**

Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (18 a 25°C) e ser misturados cuidadosamente antes da sua utilização. Não utilizar se o reagente não estiver límpido ou se apresentar um precipitado insolúvel. Os reagentes são estáveis até à data de validade indicada quando armazenados a uma temperatura entre 2 a 8°C e protegidos de contaminação, ou conforme abaixo mencionado após a abertura e/ou reconstituição.

- As tiras de teste revestidas de antígeno **STRIP**|**ANA Adv**|**LIA** estão prontas a utilizar. Antes da abertura, permitir que o saco das tiras de teste alcance a temperatura ambiente, a fim de prevenir a

condensação e deterioração associadas. Voltar a embalar as tiras de teste não utilizadas e armazená-las a uma temperatura entre 2 a 8°C em local escuro e seco.

- O Diluente das Amostras [SAMPLE][DIL] está pronto a utilizar. Após a abertura, o Diluente das Amostras [SAMPLE][DIL] ficará estável durante um período mínimo de 8 semanas quando armazenado de forma adequada e protegido de contaminação microbiana ou química.
- Reconstituir 1 parte [BUF][WASH][LIA] em 19 partes de água destilada ou desionizada para produzir 1 litro de Tampão de Lavagem. O Tampão de Lavagem ficará estável durante um período mínimo de 8 semanas após reconstituição quando armazenado de forma adequada e protegido de contaminação microbiana.
- Após a abertura, o [CONJ][LIA] e o [SUBSTRATE] ficarão estáveis durante um período mínimo de 8 semanas quando armazenados de forma adequada e protegidos de contaminação microbiana. O [SUBSTRATE] é sensível à luz e deve ser armazenado na garrafa de cor âmbar fornecida.

As tiras de antígeno só podem ser utilizadas uma vez. Não trocar os componentes de diferentes lotes. Não utilizar os reagentes após a data de validade indicada nas etiquetas.

Precauções

Todos os componentes de origem humana usados foram testados para HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram resultado negativo pelos testes exigidos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e as amostras dos doentes devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Siga as boas práticas de laboratório em relação à conservação, distribuição e eliminação dos materiais acima mencionados.¹⁰

ADVERTÊNCIA – O Proclin 300 é um conservante. Ao eliminar líquidos que contenham Proclin 300, lavar com água abundante para diluir os componentes abaixo dos níveis ativos.

Para garantir resultados válidos deve seguir-se com rigor as instruções descritas neste folheto informativo do kit. Não trocar os componentes do kit por outros de origens diferentes. Respeite as normas laboratoriais em vigor a fim de reduzir a possibilidade de contaminação microbiana ou cruzada dos reagentes durante o manuseamento. Não usar os componentes do kit após a data de validade indicada no rótulo.

RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

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

PROCEDIMENTO

Notas de Procedimento

- Ler cuidadosamente o folheto do produto antes de iniciar o ensaio.
- Antes de se iniciar o procedimento de teste, permitir que as amostras de soro e os reagentes de teste se equilibrem a temperatura ambiente durante cerca de 30 minutos. Voltar a colocar todas as amostras e os reagentes não utilizados no frigorífico imediatamente após a sua utilização.
- É fundamental utilizar uma técnica de lavagem adequada para o desempenho satisfatório do ensaio.
- Manusear as tiras de teste exclusivamente com pinças limpas ou luvas. Evitar tocar nas áreas revestidas de antígeno branco.
- Tal como descrito no esquema, as linhas de teste são colocadas acima das linhas de controlo de corte, soro e conjugado (Figura 1). As linhas de controlo do soro e conjugado aparecem no mesmo pedaço de nitrocelulose na parte inferior da tira.
- Atribuir números de identificação de amostras para as tiras respetivas no Formulário de Relatório. Para fins de rastreabilidade, cada tira possui os números de tira e lote impressos na parte inferior da mesma.
- Antes de se dar início ao ensaio, preencher todas as outras informações relevantes no Formulário de Relatório.

Método de Teste

- 1.º Passo** Utilizando luvas ou pinças rombas, retire o número de tiras necessário. Deve-se tomar cuidado para não tocar nas zonas revestidas de antígeno com as mãos ou pinças pontiagudas.
 - 2.º Passo** Colocar o número necessário de **STRIP|ANA Adv|LIA** com o lado da etiqueta voltado para cima nos poços individuais da bandeja de ensaio.
 - 3.º Passo** Deitar com uma pipeta 1,5 ml de **SAMPLE|DIL** em cada poço; certifique-se de que as tiras ficam totalmente submersas no líquido.
 - 4.º Passo** Incubar as tiras no **SAMPLE|DIL** durante pelo menos 10 minutos num agitador. A cor azul no antígeno revestido e localizações de controlo começa a desaparecer à medida que a membrana é embebida.
 - 5.º Passo** Pipetar 15 µl de soro ou amostra de controlo positivo nos poços adequados para obter uma diluição de 1:101. Incubar durante 60 minutos (±5 min.) a temperatura ambiente num agitador ou vibrador rotativo.
 - 6.º Passo** LAVAGEM: Aspirar a solução da amostra para o recipiente de resíduos. Lavar bem as tiras com o Tampão de Lavagem **reconstituído**, esguichando diretamente sobre as tiras aproximadamente 2 ml de solução. Lavar as tiras com agitação suave durante 5 minutos e aspirar a solução para o recipiente de resíduos. Repetir a lavagem mais duas vezes.
- Advertência: A lavagem completa das tiras entre incubações é fundamental para obter resultados válidos. A lavagem inadequada resultará em elevada coloração de fundo. Não permitir a secagem das tiras em qualquer passo durante o ensaio.
- 7.º Passo** Pipetar 1,0 ml de **CONJ|LIA** em cada poço. Incubar durante 30 minutos (±5 min.) a temperatura ambiente em agitador ou vibrador rotativo.
 - 8.º Passo** Repetir o 6.º Passo.
 - 9.º Passo** Pipetar 1,0 ml de **SUBSTRATE|TMB** em cada poço e incubar com agitação suave durante 10 minutos a temperatura ambiente em iluminação reduzida. Após a incubação no substrato, as linhas de controlo do soro e conjugado desenvolvem uma cor intensa. Após a incubação, a linha de controlo de corte desenvolve-se para uma linha em branco a fracamente colorida.
 - 10.º Passo** Para parar a reação, lavar as tiras 2 x com água destilada/desionizada, esguichando diretamente sobre as tiras aproximadamente 2 ml de água, seguido de aspiração. Não deixar de molhar/lavar durante mais de 10 minutos, pois tal pode resultar na diminuição da sensibilidade das linhas coloridas desenvolvidas.
 - 11.º Passo** Utilizando uma pinça romba, remover as tiras da bandeja de ensaio e colocá-las suavemente sobre papel absorvente, deixando-as secar. Permitir a secagem das tiras antes de as analisar ou afixar na folha de relatório/pontuação.

Controlo de Qualidade

Controlos de Procedimento: Cada tira tem três controlos de procedimento para a adição de soro e conjugado e uma linha de corte para determinar as reações fracas ou negativas.

Os controlos Positivo e Negativo estão disponíveis como componentes opcionais e podem ser executados para fins de controlo de qualidade adicional.

Os laboratórios individuais devem otimizar o tempo de desenvolvimento do substrato em +/- 4 minutos com base no processador de amostras ou na metodologia manual. Após a incubação com o substrato, recomenda-se que a linha de corte deva ser ligeiramente visível a olho nu.

Interpretação

As tiras de teste contêm linhas de controlo na parte inferior e uma linha de teste por cima dos controlos. A parte inferior da tira de teste (perto do número de série) possui três linhas de controlo: de cima para baixo, a linha de corte, a linha de controlo do soro e a linha de controlo do conjugado. O corte permite ao técnico determinar o resultado do teste como positivo, negativo ou indeterminado (+/-). As duas linhas de controlo de procedimento garantem a adição de amostra, conjugado e substrato.

Comparar a reação das linhas de teste com as dos controlos. O uso de uma lupa pode ser útil para a observação das reações fracas.

- Conforme marcado na Figura 1, as linhas de controlo do soro e conjugado devem ser claramente positivas, indicando uma experiência bem-sucedida. O corte é uma linha ligeira com variação de intensidade com base nas condições experimentais. O esquema na Figura 1 apresenta um exemplo de uma linha de teste. No ANA Advanced LIA (Figura 2) existem 22 linhas de teste e 3 linhas de controlo. O desenvolvimento da linha de teste depende da amostra. Podem ocorrer reações positivas em diversas intensidades, desde fracas a fortes. **As reações fracas devem ser comparadas com a intensidade da linha de corte dentro da tira.** As reações que forem nitidamente mais escuras ou mais densas do que a intensidade da linha de corte devem ser consideradas positivas.
- As tiras podem apresentar um fundo homogêneo ou descolorado devido a diversos fatores que interferem em soros lipêmicos ou hemolíticos. Este efeito pode ser igualmente observado se as tiras de teste não estiverem suficientemente bloqueadas ou se as mesmas secarem acidentalmente durante o ensaio.
- Em caso de reações positivas e negativas fracas, a intensidade da linha reagida deve ser comparada com a linha de corte para determinar o resultado como negativo (intensidade mais fraca do que a linha de corte) ou não conclusivo (+/-; indistinguível da linha de corte). A visualização das reações fracas é melhorada quando as tiras estiverem totalmente secas. As amostras não conclusivas devem ser confirmadas por meio de um método alternativo.
- As tiras secas podem ser reunidas na folha de relatório/pontuação fornecida. A aba de proteção de plástico está permanentemente colada à folha de relatório na borda do lado esquerdo. Retire cuidadosamente a aba de plástico da direita para a esquerda, como a página do livro. Coloque as tiras reagidas sobre a fita adesiva na ranhura respectiva e volte a colocar a aba de plástico no lugar. A aba de proteção em plástico é concebida para ser reutilizável para múltiplas sessões de experiências e as tiras podem ser reunidas nas ranhuras respectivas. O técnico pode utilizar o formulário para registrar os números de lote dos reagentes utilizados, o número da amostra e os resultados/comentários.

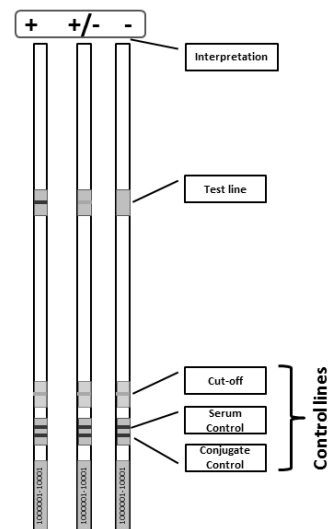


Figura 1: Esquema das tiras LIA reagidas com uma linha de teste.

Figura 2: Esquema da Folha de Relatório

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Neste procedimento só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras excessivamente hemolizadas, lipêmicas ou contaminadas microbiologicamente podem interferir nos resultados do teste, não devendo ser utilizadas. Não armazenar as amostras a uma temperatura entre 2 a 8°C por mais de uma semana. Para um armazenamento de maior duração, as amostras de soro deverão ser congeladas. Evitar o repetido congelamento e derretimento das amostras.

O ANA Advanced LIA deve ser utilizado exclusivamente como um auxiliar ao diagnóstico. Podem ser encontrados resultados positivos noutras condições autoimunes ou em determinadas doenças infecciosas. Por conseguinte, os resultados devem ser avaliados e interpretados por uma autoridade médica, à luz da história clínica do paciente e de outros resultados laboratoriais.

VALORES PREVISTOS

Conforme determinado pela metodologia da IFA, a uma concentração de 1:40, podem estar presentes níveis elevados de anticorpos antinucleares e citoplasmáticos em até 30% de indivíduos numa população “normal”. A uma concentração de 1:320 foi reportada uma queda para aproximadamente 3% no índice de positividade em população normal. A incidência de positividade de autoanticorpos varia consideravelmente com base nos antígenos específicos, estudos e em populações de amostras selecionadas. Os valores previstos numa população normal são negativos no LIA. Os painéis do LIA são concebidos para proporcionar ótima sensibilidade e especificidade. Recomenda-se que o resultado positivo seja confirmado através de uma metodologia alternativa.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Especificidades do Antígeno

O ANA Advanced LIA é capaz de detetar autoanticorpos para os antígenos seguintes: PM-Scl100, PM-Scl75, Ro-52, Ro-60, Jo-1, Ribo-P, Nucleossomas, ADN, Histonas, Sm, U1RNP68, U1RNP A, U1RNP C, SS-B/La, Scl-70, Cenp-B, PCNA, Mi-2, Ku, SRP-54 e AMA-M2 e DFS70 (LEDGF). Consulte a Figura 2 para as posições do antígeno individual e da linha de controlo.

Reatividade cruzada

Foi testado um painel de soro de doença autoimune com potencial de reação cruzada a partir de condições não associadas com o ANA utilizando o teste ANA-Advanced LIA. 1 de 550 determinações demonstraram uma reação positiva, indicando uma especificidade de 99,8% nesta população.

Interferência

A interferência foi estudada, misturando o soro com os níveis conhecidos de autoanticorpos para cada analito com amostras de soro potencialmente interferentes e estudando o desvio dos resultados previstos. Não foi demonstrada interferência significativa para as seguintes substâncias nos níveis indicados: Hemoglobina (5 mg/ml), Bilirrubina (0,4 mg/ml), Fator Reumatoide (equivalente a 200 EU) e Triglicéridos (25 mg/ml). Foram levados a cabo estudos de interferência de acordo com as diretrizes da CLSI (publicação EP7-A2).

Reprodutibilidade

Os ensaios das amostras na série negativa, não conclusiva e positiva foram realizados para determinar a reprodutibilidade qualitativa de execução para execução e de operador para operador. Os resultados produziram um acordo qualitativo de 100%.

REFERENCES • ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ • BIBLIOGRAFÍA • REFERENZEN • RÉFÉRENCES • REFERENCES • REFERÊNCIAS

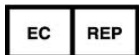
1. Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity of the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1, Cruse JM and Lewis RE Jr, Eds, Karger, Basel. 1985, 318-53.
2. Reimer G, Cornell RC and Tan EM. The biochemical nature of nuclear antigens reactive with antinuclear antibodies. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed. 1987, 519-531.
3. Tan EM, Chan EKL, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. Clin Immunol Immunopathol; 1988, 47:121-141.
4. Von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Semin Arthritis Rheum; 1985, 21:323-58.
5. Tan, EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Diseases and Probes for Cell Biology. "Advances in Immunology" Vol. 44; 1987, pp 93-151.
6. Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A and Meyer zum Büschenfeld KH. Significant autoimmune markers of autoimmune liver disorders: Current status. J Clin Lab Anal; 1987, 1:362-370.
7. Mackay IR. Autoimmunity and the liver. Clin Aspects Immunity. 2: 8- 17, 1988.
8. McMillan SA, Alderdice JM, McKee CM et al. Diversity of autoantibodies in patients with anti-mitochondrial antibody and their diagnostic value. J Clin Path 4: 232-236, 1987.
9. Ben-Chetrit, E, Fox RI, and Tan EM. Dissociation of Immune Responses to the SS-A(Ro) 52kD and 60kD polypeptides in Systemic Lupus Erythematosus and Sjögren's Syndrome. Arth. Rheum. 33, 349-355, 1990.
10. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health. 2007; (HHS Pub No [CDC] 93-8395).

For technical assistance please contact:



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

or your local product distributor



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

Rev. OCT2017

Document No. PI6011