

# READS ANA TEST

Cat. No. 10876:96 wells  
Cat. No. 10876:96 puits  
Art.-Nr. 10876:96 Auftragsstellen  
Cat. No. 10876:96 pocillos  
Cat. n. 10876:96 pozzetti

---

Corgenix, Inc.

11575 Main Street, Suite 400, Broomfield, Colorado 80020, USA  
Tel: 303-457-4345 Fax : 303-457-4519 [www.corgenixonline.com](http://www.corgenixonline.com)

- CONTENTS -  
- CONTENU -  
- INHALTSVERZEICHNIS -  
- CONTENIDO -  
- CONTENUTI -

English.....	3
Français.....	8
Deutsch.....	13
Español.....	19
Italiano.....	25
Symbols/Symboles/Symbole/Símbolos	
/Simboli.....	31

## ENGLISH

### INTENDED USE

The REAADS ANA TEST is semi-quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of disease specific anti-Nuclear antibodies in human serum. The REAADS ANA TEST is intended for in vitro diagnostic use as an aid in the determination of autoimmune diseases.

### SUMMARY AND EXPLANATION

Anti-nuclear antibodies (ANA) are autoantibodies against various cell nucleus antigens and some of them are considered to be useful for diagnosis for autoimmune diseases such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Mixed Connective Tissue Disease (MCTD), Sjögren's Syndrome (SjS), Progressive Systemic Sclerosis (PSS). Indirect immunofluorescence (IF) has been used widely to detect anti-nuclear antibodies. As the corresponding antigen can be presumed by staining pattern, it can yield information on a variety of autoantibody specificities. On the other hand, it is inconvenient when many samples are examined and it sometimes lacks assay specificity due to difference among reagents, operators and laboratory equipment.

The REAADS ANA TEST is a ELISA format test to detect disease specific anti-nuclear antibodies which are frequently observed in patients with autoimmune diseases. This test makes it possible to have objective interpretation since the results are expressed as Unit value and examines many samples in a short period of time.

### PRINCIPLE

The REAADS ANA TEST measures disease specific anti-Nuclear antibodies, anti RNP, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, Jo-1, CENP-B, Ribosomal-P, DNA and Histone antibodies present in the serum by ELISA. Calibrators and patient serum are added to microwell coated with antigens, allowing anti- Nuclear antibodies to react with the immobilized antigens (Sample incubation). After wash to remove any unbound serum proteins, horseradish peroxidase conjugated anti human IgG, IgA and IgM are added and incubated (Conjugate incubation). Following another washing step, the peroxidase substrate is added and incubated for an additional period of time (Substrate incubation). Acid solution is then added to each well to terminate the enzyme reaction and to stabilize the color development. The assay can be quantified by measuring the reaction photometrically and plotting the results.

### BRIEF ASSAY PROCEDURE

<Sample incubation> (20-25 °C) 60 min.	Add 100 µl of diluted sample (1:101) to each well of microwell plate ↓ Wash ↓
<Conjugate incubation> (20-25 °C) 60 min.	Add 100 µl of conjugate solution to each well ↓ Wash ↓
<Substrate incubation> (20-25 °C) 30 min	Add 100 µl of substrate to each well ↓ Add 100 µl of stop solution to each well ↓ Read absorbance ↓ Interpretation of result

## REAGENTS AND STORAGE

### 1) MICROWELL STRIPS

96 wells MICROWELL STRIPS (12 x 8 wells) coated with antigen produced from a mixture of recombinant purified proteins of Jo-1, RNP, SS-A, SS-B, CENP-B, Ribosomal P, in vitro transcribed U1 RNA, native purified proteins of SS-A, Sm, Scl-70, DNA and Histone, the breakaway strips packaged in a strip holder and sealed in a foil envelope with desiccant, are stable at 2-8°C until the labeled expiration date.

### 2) CALIBRATOR 1 (0 U/ml)

One vial containing 1.5 ml of Assay Diluent including 0.1% sodium azide. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### 3) CALIBRATOR 2 (100 U/ml)

One vial containing 1.5 ml of ANA positive human control serum with Assay Diluent including 0.1% sodium azide. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### 4) CONJUGATE CONCENTRATE (101X)

One vial containing 300 µl of horseradish peroxidase conjugated goat anti-human IgG, IgA and IgM (heavy chain specific) at a 101X concentration. Stable at 2-8°C until labeled expiration date. Bottle provided to prepare conjugate working solution.

### 5) CONJUGATE DILUENT

One bottle containing 24 ml of HEPES, Proclin 150 and BSA. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### 6) ASSAY DILUENT

Two 50 ml bottles containing MOPS, Tween 20, bovine serum and 0.1% sodium azide. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### 7) WASH CONCENTRATE (10X)

One 100 ml bottle containing PBS and Tween 20 as a 10X concentrate. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### 8) SUBSTRATE SOLUTION

One 20 ml bottle containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride/hydrogen peroxide (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### 9) STOP SOLUTION

One 20 ml bottle containing 1N Sulfuric acid. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### 10) POSITIVE CONTROL SERUM

One vial containing 0.2 ml of ANA positive human control serum with 0.1% sodium azide. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### 11) NEGATIVE CONTROL SERUM

One vial containing 0.2 ml of ANA negative human control serum with 0.1% sodium azide. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

## PRECAUTIONS

- (1) This product is for in vitro diagnostic use only.
- (2) Do not use kit components beyond the stated expiration dates.
- (3) Avoid contact of reagents with eyes, skin and clothing. Reagents on skin must be washed away with plenty of water. TMB contains irritant and Stop Solution consists of a 1N sulfuric acid, which is a poison and corrosive.

- (4) Calibrator 2, Positive control and Negative control are derived from human serum, in which HBs antigen, HCV antibody, HIV-1 and HIV-2 antibodies cannot be detected. No test method, however, can guarantee the absence of these or any other infectious agents. These reagents and all patient samples should be handled as if they are capable of transmitting AIDS, hepatitis or any other infectious diseases.
- (5) Calibrator 1, Calibrator 2, Positive control, Negative control and Assay Diluent contain sodium azide (0.1%) as a preservative and must be handled with caution - do not ingest or allow contact with skin or mucous membranes. Sodium azide may react with copper or lead in plumbing system to form explosive metal azides. Therefore, always flush with plenty of water when disposing materials containing sodium azide into a drain.
- (6) Some kit components contain animal origin materials, which are from non-infectious animals. These components, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- (7) Matching lot numbers of Microwell strips, Conjugate and Calibrator 2 must be used together in the assay. Do not substitute reagents from other kits.
- (8) All reagents must be brought to room temperature (20 -25°C) before starting the assay.
- (9) Do not expose the kit to direct sun during assay and storage.
- (10) Avoid microbial and cross contamination of reagents or samples.
- (11) Incubation temperatures above or below normal room temperature (20-25°C), shorter or longer time periods of incubation and inaccurate dilution may give erroneous results.
- (12) The wells must be rinsed with Wash Solution properly enough to avoid false positive.
- (13) Carefully pipette not to foam each sample and reagent to avoid cross contamination between microwells.
- (14) All microwell strips, which are not immediately required, should be returned to the zip lock pouch, which must be carefully resealed to avoid moisture absorption.
- (15) Wash concentrate may become turbid at 2-8°C, which does not cause inconsistent results.
- (16) The ANA values obtained from this assay are an aid to diagnosis only. Each physician must interpret these results in light of the patient's history, physical findings, and other diagnostic procedure.

## **MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- Microplate reader (wavelength: 450 nm, 620 nm/reference)
- Multichannel micropipette (e.g. 100 µl - 300 µl) for dispensing conjugate, substrate, and stop solution.
- Single channel pipette (10 µl & 100 µl)
- Reagent reservoir
- Autowasher or wash bottle
- Deionized or distilled water
- One liter graduated cylinder for preparation of wash solution
- Test tubes for patient sample dilutions (e.g. 1000 µl)
- Disposable pipette tips
- Paper towels
- Basin and disinfectant
- Microplate cover

## **PROCEDURE**

### **■ PREPARATION OF REAGENTS**

- Bring all assay materials to room temperature (20-25 °C) prior to use.
- Microwell Strips: Remove required microwell strip from pouch and place them in the frame. Promptly return unused strips to refrigerated storage.
- Wash Solution: Prepare 1:10 dilution of The Wash Concentrate prior to use (ex. add 100 ml of Wash Concentrate to 900 ml of distilled water). The diluted wash solution is stable for 2 weeks at 2 -8°C.

- Conjugate Solution: The Conjugate Reagent must be diluted prior to use. Dilute the Conjugate Reagent 1:101 with Conjugate Diluent. The diluted Conjugate Solution must be used within a day. Use disposable reservoir to avoid contamination.
- Do not dilute Calibrator 1, Calibrator 2, Assay Diluent, Substrate and Stop Solution, which are ready-to-use.

## ■ PREPARATION OF SAMPLES

- Use fresh patient sera. If storage is needed, they should be frozen below -20°C for up to one month, below -70°C for longer storage. Do not repeat freezing and thawing.
  - \*In case stored below -20°C for more than 6 months or freezing and thawing repeatedly, nonspecific results are obtained because of IgG denaturing.
- Dilute each patient serum 1:101 by adding 10µl of serum to 1ml of Assay Diluent.
  - \*Diluted samples may be stored up to 3 days if refrigerated.
  - \*Assay Diluent may form precipitate, which does not cause inconsistent results.

## ■ ASSAY PROCEDURE

### STEP 1. (SAMPLE INCUBATION)

Using the multi-channel pipetor, transfer 100µl of each diluted sample, Positive and Negative Controls into the appropriate microwells of the antigen test plate. Add Calibrators directly to appropriate wells. (Do not dilute Calibrators.)

\* Incubation starts on pipetting to the antigen-coated microwells. Pipetting should be completed as quickly as possible.

Cover wells with a plate sealer and incubate for 60 minutes at room temperature (20-25 °C).

### STEP 2. (WASHING)

Aspirate or discard the well contents. Fill the well with Wash Solution and then completely aspirate or discard the contents. Wash 4 times. Tap the plate on a paper towel to remove any remaining Wash Solution. When autowasher is used, wash 4 times.

\* Each laboratory is recommended to confirm its own appropriate washing times and set- up.

\* Wash Solution should be used at 20-25°C.

### STEP 3. (CONJUGATE INCUBATION)

Pour Conjugated Reagent into a reservoir. Add 100 µl of the Conjugated Reagent to each well with multichannel pipette. Cover wells with the plate sealer and incubate for 60 minutes at room temperature (20-25°C).

### STEP 4. (WASHING)

Wash the microplate following the STEP 2 procedure.

### STEP 5. (SUBSTRATE INCUBATION)

Pour Substrate into a reservoir and pipette 100 µl of the Substrate to each well with multichannel pipette.

\* The reservoir should be different from the one, which was used for pouring conjugate solution. A new disposable reservoir should be used because Substrate is easily oxidized by metal ion.

\* The Substrate, once poured in a reservoir, should not be returned to the bottle.

Cover wells with the plate sealer and incubate for 30 minutes at room temperature (20-25°C).

### STEP 6. (STOP REACTION)

Pour Stop Solution into a reservoir. Pipette 100 µl of the solution to each well with multichannel pipette.

## ■ READING

Read the absorbance of each well at 450 nm. If a dual wave length platereader is available, set the test wavelength at 450 nm and the reference at 620 nm.

\* Reading should be done as quickly as possible after stopping the reaction.

\* Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no air bubbles are present on the surface of the liquid in the wells before reading the plate.

## ■ CALCULATION OF RESULT

$$\text{Unit value (U/ml)} = \frac{(A_{450}\langle\text{Sample}\rangle - A_{450}\langle\text{Calibrator 1}\rangle)}{(A_{450}\langle\text{Calibrator 2}\rangle - A_{450}\langle\text{Calibrator 1}\rangle)} \times 100$$

\* A<sub>450</sub> is abbreviation of absorbance value at 450 nm.

\* An appropriate international reference material for measuring anti nuclear antibody by ELISA is not available; the assay is calibrated in relative arbitrary units.

## ■ QUALITY CONTROL

Each assay result should meet the following criteria.

A<sub>450</sub> of Calibrator1: ≤0.100

A<sub>450</sub> of Calibrator 2: >0.500

The Positive and Negative Controls must give the following results:

	Positive Control	Negative Control
Anti-ANA value (U/ml)	>40	<21

If any of these are not met, the results are invalid and the test should be repeated.

Before repeating assay, check the following procedure.

- Incubation Temperature
- Incubation Period of Time
- Washing

## TEST INTERPRETATION AND EXPECTED VALUES

The following is intended only as a guide for interpretation. Each laboratory is recommended to establish its own criteria for test interpretation based on sample populations typically encountered.

Anti-ANA value (U/ml)	Interpretation
<21	Negative for anti-ANA Ab
Greater than or equal to 21	Positive for anti-ANA Ab

The above ANA value was determined by ROC analysis with 695 serum samples of autoimmune disease and healthy blood donors.

## ■ LIMITATIONS

As with other diagnostic test procedures, the results obtained with the REAADS TEST ANA serve only as an aid to diagnosis and should not be interpreted as diagnostics in themselves.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### ■ CLINICAL SPECIFICITY AND SENSITIVITY

Disease	Positive sample	Positive rate
MCTD	55/56	98.2%
SLE	96/102	94.1%
SjS	44/46	95.7%
SSc	52/55	94.5%
PM/DM	18/27	66.7%
Normal Serum	2/38	5.3%

MCTD: Mixed connective tissue disease

SLE: Systemic lupus erythematosus

SjS: Sjögren's Syndrome

SSc: Systemic sclerosis

## ■ PRECISION

Repeatability was demonstrated by testing 3 samples in sextuple. Reproducibility was determined by testing 3 samples on 5 different days (day-to-day) and by testing 3 samples in 3 lots (lot-to-lot). %CV values for reproducibility and repeatability were below 15% for each sample.

## ■ ASSAY RANGE

The assay range of this kit is from 5U/ml to 200U/ml.

## ■ INTERFERING SUBSTANCES

Hemoglobin (up to 470 mg/dl), Bilirubin (up to 17.7mg/dl) and/or chyle (up to 2,490 unit as Formazine) are not affective on the assay result, but avoid using highly hemolysed samples or highly lipemic samples.

## REFERENCES

1. Tsay, G.J. et al.: An immunoassay differentiating sera with antibodies to Sm alone, antibodies to Sm/RNP complex, and antibodies to RNP alone. *Arthritis & Rheum.* 30: 389-396, (1987).
2. Tojo, T. et al.: Diversity of autoantibodies and their clinical significance in systemic autoimmune diseases. *Medical immunology* 14: 761-766, (1987).
3. Sharp, G.C. et al.: Mixed connective tissue disease: an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Amer. J. Med.* 52: 148-152, (1972).
4. Query, C.C. et al.: A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* 57: 89-101, (1989).
5. Query, C.C. et al.: A human autoimmune protein associated with U1 RNA contains a region of Homology that is cross-reactive with retroviral p30gag antigen. *Cell* 51: 211-220, (1987).
6. Krapf, A.R., C.A. von Mühlen, F.E. Krapf, R.M. Nakamura, E. Tan, *Atlas of Immunofluorescent Autoantibodies*, Urban & Schwarzenberg, Baltimore, MD. , 1996.

## **BUT DU DOSAGE**

Le REAADS ANA TEST est une trousse de dosage semi-quantitative (ELISA) pour la détection de anticorps anti-nucléaires spécifiques d'une maladie dans le sérum humain. Le but du REAADS ANA TEST est situé dans le diagnostic in vitro comme un moyen de détermination de maladies auto-immunes.

## **RESUME ET EXPLICATION**

Les anticorps antinucléaires (ANA) sont des autoanticorps dirigés contre différents antigènes du noyau cellulaire et certains d'entre eux constituent des paramètres permettant le diagnostic de maladies auto-immunes telles que le Lupus Erythémateux Systémique (LED), les connectivites mixtes (MCTD), le syndrome de Sjögren (SjS) et la sclérodémie progressive systémique (PSS). L'immunofluorescence indirecte (IF) est largement utilisée pour détecter les anticorps antinucléaires. Selon l'aspect observé en IF, on peut conclure à l'existence de différents types d'autoanticorps. Cependant cette méthode a ses limites car on ne peut pas effectuer de grandes séries de tests et elle peut parfois manquer de spécificité en raison des variations entre les réactifs utilisés, le personnel effectuant le test et l'équipement du laboratoire.

La trousse REAADS ANA TEST permet de détecter par méthode ELISA les anticorps antinucléaires fréquemment décelés chez les patients atteints de maladie auto-immune. Ce test permet d'obtenir un élément objectif de diagnostic car les résultats sont exprimés en valeur index et car on peut examiner de nombreux échantillons différents en un laps de temps bref.

## **PRINCIPE DU TEST**

Le REAADS ANA TEST permet de mesurer par ELISA les anticorps anti-nucléaires spécifiques d'une maladie, l'anti RNP, le Sm, le SS-A, le SS-B, le Scl-70, le Jo-1, le CENP-B, le Ribosomal-P, l'ADN et les anticorps Histone présents dans le sérum. Des calibrateurs et des sérums des patients sont ajoutés dans des micro-puits sensibilisés avec des antigènes immobilisés. Les anticorps anti-ANA vont se lier aux molécules cibles immobilisées (Étape d'incubation avec l'antigène). Après une étape de lavage permettant d'éliminer les protéines non liées, un anticorps de chèvre anti-IgG, IgA et IgM humaine conjugué à la peroxydase est ajouté (Étape d'incubation du conjugué). Après une deuxième étape de lavage, du substrat peroxydase est ajouté (Étape d'incubation du conjugué). Puis une solution stop (acide sulfurique) est ajoutée dans chaque puits pour arrêter le développement de la réaction. Ce test peut être quantifié en mesurant l'intensité de la réaction au spectrophotomètre et en faisant le graphique des résultats.

## **PROTOCOLE SIMPLIFIÉ**

<Incubation de l'échantillon> (20-25 °C) 60 min.	Ajouter dans les micro-puits sensibilisés aux antigènes nucléaires: Echantillon dilué au 1 : 101 ↓ Laver ↓
<Incubation de conjugué> (20-25 °C) 60 min.	Solution de conjugué (100 µL) ↓ Laver ↓
<Incubation de substrat> (20-25 °C) 30 min	Substrat (100 µL) ↓ Solution d'arrêt (100 µL) ↓ Lecture de l'absorbance à 450 nm ↓ Interprétation des résultats

## REACTIFS FOURNIS ET STOCKAGE

### 1) MICRO PLAQUE

12 Barrettes de 8 micropuits sensibilisés avec des antigènes nucléaires recouverts d'antigène fait d'un mélange de protéines purifiées recombinantes de Jo-1, RNP, SS-A, SS-B, CENP-B, Ribosomal P, ARN U1 transcrit in vitro, des protéines natives purifiées de SS-A, Sm, Scl-70, ADN et Histone, les bandes de séparation emballées dans un porte-bandes et cachetées dans une enveloppe aluminium avec du dessicant, sont stables à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### 2) CALIBRATEUR 1 (0 U/ml)

Un flacon avec 1,5 mL de diluant sérum comprenant 0,1% d'azide de sodium. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### 3) CALIBRATEUR 2 (100 U/ml)

Un flacon avec 1,5 mL d'ANA sérum humain contrôle positif avec du diluant sérum comprenant 0,1% d'azide de sodium. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### 4) CONJUGUE (101X)

Un flacon avec 30 ml d'anticorps de chèvre anti-IgG, IgA et IgM (spécifique d'une chaîne lourde) humains couplés à de la peroxydase à une concentration 101X. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée. Bouteille pour préparer la solution de travail de conjugué incluse.

### 5) DILUANT CONJUGUE

Un flacon avec 24 ml d'HEPES, Proclin 150 et de l'albumine bovine. Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### 6) DILUANT SERUM

Deux flacons de MOPS, Tween 20, du sérum bovin et 0,1% d'azide sodium. Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### 7) TAMPON DE LAVAGE (10X)

Un flacon avec 100 mL de PBS et Tween 20 comme un concentré 10x. Stable à 2-8°C jusqu'à date d'expiration indiquée.

### 8) SUBSTRAT

Un flacon avec 20 mL de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride/peroxide d'hydrogène (TMB/ $H_2O_2$ ). Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### 9) SOLUTION D'ARRET

Un flacon avec 20 mL de 1N acide sulfurique. Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration.

### 10) CONTROLE POSITIF ANA

Un flacon avec 0,2 mL d'ANA sérum humain contrôle positif avec 0,1% d'azide sodium. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### 11) CONTROLE NEGATIF ANA

Un flacon avec 0,2 ml d'ANA sérum humain contrôle négatif avec 0,1% d'azide sodium. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

## PRECAUTIONS

- (1) Pour utilisation en diagnostic in vitro uniquement.
- (2) Ne pas utiliser les éléments de la trousse après la date de péremption indiquée.
- (3) Eviter tout contact des réactifs avec les yeux, la peau ou les vêtements. En cas de contact des réactifs avec la peau, laver avec beaucoup d'eau. TMB contient des matières irritantes et la Solution d'arrêt consiste en un acide sulfurique 1N, qui est toxique et corrosif.

- (4) Les calibrateurs sont préparés à partir de sérums humains, qui ont été testés négatifs pour l'antigène HBs, les anticorps anti-HCV, HIV-1 et HIV-2. Aucune méthode ne pouvant garantir l'absence de ces virus ou d'autres virus pathogènes. Ces réactifs et tous les échantillons des patients doivent être manipulés comme s'ils étaient capables de transmettre le SIDA, l'hépatite ou d'autres maladies infectieuses.
- (5) Les calibrateurs (1&2), Contrôle positif, Contrôle négatif et le diluant sérum contiennent 0,1% d'azide de sodium comme conservateur et doivent être manipulés avec précaution - ne pas ingérer ou permettre du contact avec la peau ou avec les membranes muqueuses. L'azide peut provoquer des réactions explosives dans les conduites en fer ou cuivre. Faire couler l'eau en abondance lorsqu'on se débarrasse de ces produits.
- (6) Certains composants de la trousse contiennent des matières d'origine animale, provenant d'animaux non-infectés. Cependant, ces composants doivent être manipulés comme des dangers biologiques potentiels, lors de l'utilisation ainsi que lors du traitement des déchets.
- (7) Utiliser obligatoirement les mêmes lots de barrettes de micro puits, de solution de conjugué et de Calibrateurs. Ne pas substituer des réactifs d'autres trusses.
- (8) Ramener tous les composants de la trousse à température ambiante (20-25°C) avant emploi.
- (9) Ne pas exposer les éléments de la trousse à la lumière pendant son utilisation ou sa conservation.
- (10) Eviter la contamination croisée et microbienne des réactifs ou des échantillons.
- (11) Une température d'incubation en deçà ou au-delà de la température ambiante (20-25°C) ainsi que des temps d'incubation augmentés ou raccourcis ou des dilutions imprécises peuvent donner des résultats erronés.
- (12) Les puits doivent être lavés de façon correcte et suffisante avec la solution de lavage pour éviter d'obtenir des résultats faux positives.
- (13) Pipeter de façon à éviter la formation de bulles dans les échantillons et les réactifs pour éviter la contamination croisée entre les micro-puits.
- (14) Remettre dans le sachet à fermeture éclair les barrettes de micro puits non utilisées, bien refermer cet étui pour empêcher une hydratation des réactifs.
- (15) La solution de lavage concentrée peut être trouble à 2-8°C, sans pour autant influencer la qualité des résultats obtenus. Avant de préparer la solution de lavage, bien agiter la solution concentrée.
- (16) Les valeurs d'ANA obtenus par ce test ne sont qu'un moyen de diagnostic. Chaque médecin doit interpréter ces résultats dans le cadre de l'histoire du patient, des constats médicaux et d'autres procédures diagnostiques.

#### **MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI**

- Lecteur de micro plaque (longueur d'onde: 450nm, 620 nm/référence)
- Pipette multicanaux (p.e. 100µl – 300µl) pour distribuer le conjugué, le substrat et la solution d'arrêt.
- Pipette automatique (10µl & 100µl)
- Réservoir des réactifs
- Laveur de micro plaque ou flacon pour le tampon de lavage
- Eau désionisée ou distillée
- Verre gradué d'un litre pour la préparation de la solution de lavage
- Eprovettes pour la dilution des échantillons du patient (e.g.1000µl)
- Pointes de pipette jetables
- Serviettes en papier
- Bassin et désinfectant
- Couverture de micro-plaque

## PROCEDURE

### ■ PREPARATION DES REACTIFS

- Amener tous les réactifs à température ambiante (20-25 °C) avant utilisation.
- Micro plaque: Retirer le nombre de barrettes nécessaire du sachet et les placer dans le support. Remettre immédiatement au réfrigérateur les barrettes non utilisées.
- Solution de lavage: La solution de lavage concentrée doit être diluée avant emploi. Diluer au 1 : 10. (p.e. ajouter 100 ml de Concentré de Lavage à 900 ml d'eau distillée). La solution de lavage diluée est stable pendant 2 semaines à 2-8 °C.
- Conjugué: Le conjugué doit être dilué avant emploi Diluer au 1 : 101 avec le diluant conjugué. La solution de conjugué dilué doit être utilisée le jour même. Utiliser un récipient à usage unique pour éviter les contaminations.
- Ne pas diluer les Calibrateurs (1&2), Diluant Sérum, Substrat et Solution d'arrêt, qui sont prêts à utiliser.

### ■ PREPARATION DES PRELEVEMENTS

- Utiliser des sérums fraîchement prélevés. Si les échantillons ne sont pas utilisés immédiatement, aliquoter et congeler à -20 °C pour un mois ou à -70 °C pour une plus longue période. Eviter les étapes de congélation-décongélation.
  - \* En cas de stockage au-dessous de -20 °C pendant plus de 6 mois ou en cas de congélation-décongélation successive, des résultats non-spécifiques sont obtenus à cause de la dénaturation d'IgG.
- Diluer chaque sérum de patient au 1 : 101 en ajoutant 10 µL de sérum à 1 mL de diluant sérum.
  - \*Des échantillons dilués peuvent être gardés jusque 3 jours s'ils sont réfrigérés.
  - \*Le Diluant de Test peut former de la précipitation, ce qui ne provoque pas de résultats inconsistants.

### ■ PROTOCOLE

#### PHASE 1. (INCUBATION DE L'ÉCHANTILLON)

Transférer 100µl de chaque échantillon dilué et de chaque Contrôle Positif et Négatif dans les micropuits appropriés de la plaque de test d'antigène, utilisant la pipette multicanaux. Ajouter les Calibrateurs directement aux puits appropriés. (Ne pas diluer les Calibrateurs.)

\* L'incubation démarre au moment où les échantillons sont déposés dans les micro-puits. Procéder le plus rapidement possible à cette étape.

Recouvrir les puits avec un cachet de plaque et incuber à température ambiante (20-25 °C) pendant 30 minutes.

#### PHASE 2. (LAVAGE)

Aspirer ou éliminer le contenu des puits. Remplir les puits avec la solution de lavage et aspirer complètement ou éliminer le liquide. Faire 4 lavages. Retourner la plaque sur un papier absorbant et tapoter pour éliminer tout le liquide. Si un laveur automatique est utilisé, laver 4 fois.

\*On recommande à chaque laboratoire d'établir ses propres conditions de lavage (mise en place et temps).

\*La solution de lavage doit être à température ambiante (20-25 °).

#### PHASE 3. (INCUBATION DU CONJUGUE)

Transférer la solution de conjugué dans le réservoir. Pipeter 100 µL de la solution de conjugué dans chaque puits à l'aide d'une pipette multicanaux. Recouvrir les puits avec un cachet et incuber à température ambiante (20-25 °) pendant 60 minutes.

#### PHASE 4. (LAVAGE)

Laver la micro-plaque selon la procédure de la PHASE 2.

## PHASE 5. (INCUBATION DU SUBSTRAT)

Transférer la solution de substrat dans un réservoir. Pipeter 100 µL de la solution de substrat dans chaque puits à l'aide d'une pipette multicanaux.

\*Ce réservoir doit être différent de celui utilisé pour la solution de conjugué. Un réservoir neuf doit être utilisé car la solution de substrat est facilement oxydée par la présence d'ions métalliques.

\* Le Substrat, dès qu'il a été transféré dans un réservoir, ne peut pas être remis dans la bouteille.

Recouvrir les puits avec un cachet de plaque et incuber à température ambiante (20-25 °C) pendant 30 minutes.

## PHASE 6. (ARRET DE LA REACTION)

Transférer la solution d'arrêt dans un réservoir. Pipeter 100 µL de cette solution dans chaque puits avec une pipette multicanaux.

### ■ LECTURE

Lire l'absorbance de chaque puits à 450 nm. Si on utilise un lecteur avec un double faisceau, lire les puits à 450 nm et la référence à 620 nm.

\*La lecture doit être effectuée aussi vite que possible après avoir arrêté la réaction.

\*Vérifier si le fond de la plaque est propre et sec, et s'il n'y a pas de bulles à la surface de la liquide des puits avant de lire la plaque.

### ■ CALCUL DES RESULTATS

$$\text{Valeur Index} = \frac{(\text{DO}_{450 \text{ nm}} \langle \text{Ech} \rangle - \text{DO}_{450 \text{ nm}} \langle \text{Cal. 1} \rangle)}{(\text{DO}_{450 \text{ nm}} \langle \text{Cal. 2} \rangle - \text{DO}_{450 \text{ nm}} \langle \text{Cal. 1} \rangle)} \times 100$$

\*DO 450 nm est la valeur de l'absorbance à 450 nm.

\*Il n'y a pas de données de référence internationales pour la mesure d'anticorps anti-nucléaires par ELISA; le test est calibré en unités relativement arbitraires.

### ■ VALIDATION DES RESULTATS

Pour valider le test, tenir compte des indications suivantes.

La D.O<sub>450 nm</sub> du Calibrateur 1 ne doit pas être ≤0,100.

La D.O<sub>450 nm</sub> du Calibrateur 2 doit être supérieure >0,500

Les Contrôles Positifs et Négatifs doivent donner les résultats suivants:

	Contrôle positif	Contrôle négatif
Anti-ANA valeur index (U/ml)	>40	<21

Si ce n'est pas le cas, le dosage n'est pas valide et doit être répété.

Auparavant, vérifier les paramètres suivants.

- Température d'Incubation
- Délai d'Incubation
- Lavage

## INTERPRETATION ET VALEURS ATTENDUES

Les données suivantes sont fournies afin de faciliter l'interprétation. On recommande à chaque laboratoire d'élaborer ses propres critères pour l'interprétation du test basés sur des populations d'échantillons typiques.

Valeur Anti-ANA (U/ml)	Interprétation
<21	Négatif pour anti-ANA Ab
Supérieur ou égal à 21	Positif pour anti-ANA Ab

La valeur ANA ci-dessus a été déterminée par une analyse ROC avec 695 échantillons de sérum provenant de donneurs de sang sains et souffrants d'une maladie auto-immune.

### ■ LIMITATIONS

Comme dans d'autres procédures de test diagnostiques, les résultats obtenus avec le REAADS ANA TEST ne peuvent être qu'un moyen diagnostique qui ne peut pas être interprété lui-même comme un diagnostic.

## PERFORMANCES

### ■ SPECIFICITE ET SENSIBILITE CLINIQUE

Maladie	Echantillon positif	Valeur positive
MCTD	55/56	98,2%
SLE	96/102	94,1%
SjS	44/46	95,7%
SSc	52/55	94,5%
PM/DM	18/27	66,7%
Sérum Normal	2/38	5,3%

MCTD: Connectivité mixte

SLE: Lupus érythémateux systémique

SjS: Syndrome de Sjögren

SSc: Sclérose systémique

### ■ PRECISION

La répétabilité a été démontrée en testant 3 échantillons en sextuple. La reproductibilité a été déterminée en testant 3 échantillons à 5 jours différents (jour-à-jour) et en testant 3 échantillons en 3 lots (lot-à-lot). Valeurs %CV pour reproductibilité et répétabilité étaient au-dessous des 15% pour chaque échantillon.

### ■ PORTEE DU TEST

La portée de cette trousse va de 5U/ml à 200U/ml.

### ■ INTERFERENCES

L'Hémoglobine (jusque 470 mg/dl), la Bilirubin (jusque 17,7mg/dl) et/ou le chyle (jusque 2,490 unités comme Formazine) n'influencent pas le résultat du test, mais éviter d'utiliser des échantillons très hémolysés ou lipémiques.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Tsay, G.J. et al.: An immunoassay differentiating sera with antibodies to Sm alone, antibodies to Sm/RNP complex, and antibodies to RNP alone. *Arthritis & Rheum.* 30: 389-396, (1987).
2. Tojo, T. et al.: Diversity of autoantibodies and their clinical significance in systemic autoimmune diseases. *Medical immunology* 14: 761-766, (1987).
3. Sharp, G.C. et al.: Mixed connective tissue disease: an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Amer. J. Med.* 52: 148-152, (1972).
4. Query, C.C. et al.: A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* 57: 89-101, (1989).
5. Query, C.C. et al.: A human autoimmune protein associated with U1 RNA contains a region of Homology that is cross-reactive with retroviral p30gag antigen. *Cell* 51: 211-220, (1987).
6. Krapf, A.R., C.A. von Mühlen, F.E. Krapf, R.M. Nakamura, E. Tan, *Atlas of Immunofluorescent Autoantibodies*, Urban & Schwarzenberg, Baltimore, MD. , 1996.

## **VERWENDUNGSZWECK**

REAADS ANA TEST ist ein semi-quantitativer Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von Antinukleären Autoantikörpern in Humanserum. Der REAADS ANA TEST dient zum Einsatz in-vitro als Hilfestellung bei der diagnostischen Abklärung von Autoimmunerkrankungen.

## **ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG**

Antinukleäre Autoantikörper (ANA) sind gegen unterschiedliche Bestandteile des Zellkerns gerichtet. Einige dieser Autoantikörper gelten als hilfreich bei der Diagnostik von Autoimmunerkrankungen wie systemischen Lupus erythematodes (SLE), Mischkollagenose (MCTD), Sjögren-Syndrom (SjS), und Progressiver Systemsklerose (PSS). Die indirekte Immunfluoreszenz (IF) wird am häufigsten zum Nachweis von ANA eingesetzt. Die Fluoreszenzmuster liefern dabei einen Hinweis auf die entsprechenden Antigene und damit auf die mögliche Spezifität der Autoantikörper. Andererseits, ist diese Technik weniger geeignet, wenn viele Proben untersucht werden sollen und das Ergebnis ist abhängig von den Reagenzien, dem Mikroskop und dem Mikroskopisten. Der REAADS ANA TEST ist ein ELISA zum Nachweis von ANA in Humanserum. Dieser Test erlaubt eine objektive Bestimmung von ANA in arbiträren Einheiten und ermöglicht die Untersuchung vieler Proben in kurzer Zeit.

## **TESTPRINZIP**

Mit REAADS ANA TEST werden Autoantikörper gegen u.a. RNP, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, Jo-1, CENP-B, ribosomales P, DNS und Histone in Serum mittels ELISA bestimmt. Die Standards und Patientenseren werden den mit Antigenen beschichteten Vertiefungen in einer Mikrotiterplatte hinzugefügt. Im Folgenden reagieren die Autoantikörper mit den Antigenen an der Festphase (Probeninkubation). Nach einem Waschschrift, zur Entfernung nicht gebundener Serumproteine, werden mit Meerrettichperoxidase markierte polyklonale Ziegenantikörper gegen Human-IgG, -IgM und -IgA hinzugefügt. Im Folgenden reagieren sie mit den an der Festphase gebundenen Autoantikörpern (Konjugatinkubation). Nach einem zweiten Waschschrift wird das Peroxidasesubstrat hinzugefügt. Es folgt die Substratinkubation. Dann wird Säure in die Vertiefungen gegeben, um die Enzymreaktion abzustoppen und die Farbentwicklung zu stabilisieren. Anschließend werden die Vertiefungen photometriert und die Ergebnisse in quantitativen Einheiten ermittelt.

## **KURZFASSUNG DER TESTDURCHFÜHRUNG**

	In jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte 100 µl verdünnte Probe (1:101) hinzufügen
<Probeninkubation> (20-25 °C) 60 Min.	↓ Waschen ↓
<Konjugatinkubation> (20-25 °C) 60 Min.	In jede Vertiefung 100 µl Konjugat geben ↓ Waschen ↓
<Substratinkubation> (20-25 °C) 30 Min.	In jede Vertiefung 100 µl Substrat geben ↓ In jede Vertiefung 100 µl Stopplösung geben ↓ Photometrieren ↓ Ergebnisse auswerten

## REAGENZIEN UND IHRE LAGERUNG

### 1) MIKROTITERSTREIFEN

12 Mikrotiterstreifen mit jeweils 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit einer Mischung aus den folgenden Antigenen: gereinigte rekombinante Proteine von Jo-1, RNP, SS-A, SS-B, CENP-B, ribosomales P-Protein; in-vitro transkribierte U1 RNS, native, gereinigte Proteine SS-A, Sm, Scl-70, DNS und Histone. Die Streifen mit Halterahmen sind in einem Folienbeutel mit Trockenmittel verpackt. Sie sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach dem Öffnen können nicht benötigte Streifen im wieder versiegelten Beutel bei 2-8°C für 60 Tage gelagert werden.

### 2) KALIBRATOR 1 (0 U/ml)

Ein Fläschchen mit 1,5 ml Probendiluent. Enthält 0,1% Natriumazid. Gebrauchsfertig. Nicht verdünnen. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### 3) KALIBRATOR 2 (100 U/ml)

Ein Fläschchen mit 1,5 ml ANA-positivem Humanserum und Probendiluent. Enthält 0,1% Natriumazid. Gebrauchsfertig. Nicht verdünnen. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### 4) KONJUGAT (101x)

Ein Fläschchen mit 0,3 ml mit Meerrettichperoxidase markierten polyklonalen Ziegenantikörpern gegen Human-IgG, -IgA und -IgM (schwere Ketten-spezifisch). Konzentrat (101x). Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Flasche zur Herstellung der gebrauchsfertigen Konjugatlösung wird mitgeliefert.

### 5) KONJUGATDILUENT

Eine Flasche (24 ml) mit HEPES, Proclin 150 und BSA. Gebrauchsfertig. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### 6) PROBENDILUENT

Zwei Flaschen (50 ml) mit MOPS, Tween 20, Rinderserum und 0,1% Natriumazid. Gebrauchsfertig. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### 7) KONZENTRIERTE WASCHLÖSUNG (10X)

Eine Flasche (100 ml) mit PBS und Tween 20; Konzentrat (10x). Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### 8) SUBSTRATLÖSUNG

Eine Flasche (20 ml) mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid/Wasserstoffperoxid (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Gebrauchsfertig. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### 9) STOPPLÖSUNG

Eine Flasche (20 ml) mit 1 N Schwefelsäure. Gebrauchsfertig. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### 10) POSITIVES KONTROLLSERUM

Ein Fläschchen mit 0,2 ml ANA-positivem Humanserum. Enthält 0,1% Natriumazid. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### 11) NEGATIVES KONTROLLSERUM

Ein Fläschchen mit 0,2 ml ANA-negativem Humanserum. Enthält 0,1% Natriumazid. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- (1) Nur für in-vitro Diagnostik.
- (2) Die Bestandteile eines Testkits nicht über ihr Verfallsdatum hinaus verwenden.
- (3) Berührung der Reagenzien mit Augen, Haut und Bekleidung vermeiden. Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser spülen. TMB ist ein Reizmittel und die Stopplösung enthält 1 N Schwefelsäure, einen giftigen und ätzenden Stoff.

- (4) Der Kalibrator 2, die positiven und negativen Kontrollseren sind aus Humanseren hergestellt, die mit negativem Ergebnis auf HBs-Antigen, HCV- sowie HIV 1 und HIV 2-Antikörper untersucht wurden. Indes kann kein Testverfahren gewährleisten, dass diese oder andere infektiöse Erreger nicht vorhanden sind. Diese Reagenzien und alle Patientenproben sollten daher so behandelt werden, als könnten sie AIDS, Hepatitis oder andere Infektionskrankheiten übertragen.
- (5) Die Kalibratoren, positiven und negativen Kontrollseren und der Probediluent enthalten Natriumazid (0,1%) als Konservierungsstoff. Sie müssen mit Vorsicht behandelt werden. Nicht einnehmen und nicht mit Haut und Schleimhäuten in Berührung bringen. Natriumazid kann mit Kupfer- oder Bleirohren unter Ausbildung explosiver Metallazide reagieren. Falls Natriumazid-haltige Lösungen in den Ausguss entsorgt werden, sollte daher mit viel Wasser gespült werden.
- (6) Einige Bestandteile des Kits enthalten Materialien aus nicht-infizierten Tieren. Trotzdem sollten diese Bestandteile als potentiell biogefährlich gehandhabt und entsorgt werden.
- (7) Nur die Mikrotiterstreifen zusammen mit den Kalibratoren aus Kits der gleichen Charge verwenden. Die Reagenzien aus unterschiedlichen Kitchargen nicht gegenseitig austauschen.
- (8) Vor Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.
- (9) Während der Lagerung und Testdurchführung den Kit und seine Reagenzien vor der Sonne schützen.
- (10) Reagenzien und Proben vor Verunreinigung durch Mikroorganismen und gegenseitigen Kontakt schützen.
- (11) Entgegen den Empfehlungen in der Testanleitung veränderte Inkubationstemperaturen, Inkubationszeiten und Verdünnungen können die Ergebnisse verfälschen.
- (12) Die Vertiefungen müssen sorgfältig mit der Waschlösung gewaschen werden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.
- (13) Beim Pipettieren der Proben und Reagenzien Schaumbildung vermeiden, um einer Verschleppung auf benachbarte Vertiefungen vorzubeugen.
- (14) Nicht benötigte Mikrotiterstreifen müssen sofort wieder in den Folienbeutel gelegt und dieser sorgfältig versiegelt werden, damit kein Kondenswasser gebildet wird.
- (15) Das Waschlösungskonzentrat kann bei 2-8 °C trüb werden. Für die Ergebnisse ist das unerheblich.
- (16) Die mit diesem Test ermittelten ANA-Spiegel sind nur als Hilfestellung zur Diagnosefindung zu betrachten. Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss der Arzt die anamnestische Erhebung, die Befunde der körperlichen Untersuchung und die Daten anderer diagnostischer Verfahren berücksichtigen.

#### **BENÖTIGTE, ABER NICHT GELIEFERTE MATERIALIEN**

- Mikrotiterplatten Reader (Wellenlänge: 450 nm, 620 nm/Referenzfilter)
- Multikanalpipette (100 µl – 300 µl) zum Pipettieren von Konjugat, Substrat und Stopplösung.
- Pipette für 10 µl und 100 µl
- Gefäße für Reagenzien
- Waschgerät oder Spritzflasche
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Messzylinder (1 Liter) zur Herstellung der Waschlösung
- Röhrchen für die Probenverdünnungen (1000 µl)
- Einmal-Pipettenspitzen
- Papierhandtücher
- Schüssel und Desinfektionsmittel
- Klebefolie

## TESTDURCHFÜHRUNG

### ■ HERSTELLUNG DER REAGENZIEN

- Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.
- Mikrotiterstreifen: Benötigte Streifen dem Folienbeutel entnehmen und im Halterahmen verankern. Beutel mit den nicht benötigten Streifen sofort wieder versiegeln und im Kühlschrank aufbewahren.
- Waschlösungskonzentrat 1:10 verdünnen (z.B. 100 ml Waschlösungskonzentrat in 900 ml Aqua dest. geben). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist 2 Wochen bei 2-8°C haltbar.
- Konjugatlösung: Das Konjugat muss vor Gebrauch 1:100 mit dem Konjugatdiluent verdünnt werden (z.B. 0,1 ml Konjugat und 9,9 ml Konjugatdiluent). Die verdünnte Konjugatlösung muss binnen einem Tag verwendet werden. Zum Verdünnen ein sauberes (Einweg-)Gefäß benutzen, um eine Kontamination zu vermeiden.
- Die Kalibratoren, der Probediluent, das Substrat und die Stopplösung sind alle gebrauchsfertig. Sie dürfen nicht verdünnt werden.

### ■ HERSTELLUNG DER PROBEN UND KONTROLLSEREN

- Wenn möglich, sollten frisch gewonnene Patientenserum verwendet werden. Sie können einen Monat bei -20°C oder länger bei -70°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.
- \*Wiederholtes Einfrieren und Auftauen oder Lagerung bei -20 °C über einen längeren Zeitraum als 6 Monate kann die Ergebnisse verfälschen, weil IgG in den Proben denaturiert wird.
- Die Patientenserum sowie die negativen und positiven Kontrollserum 1:101 verdünnen (z.B. 10 µl Serum in 1 ml Probediluent pipettieren).
  - \*Die verdünnten Serum können 3 Tage in einem Kühlschrank aufbewahrt werden.
  - \* Ggf. im Probediluent vorhandene Ablagerungen sind ohne Bedeutung für die Testergebnisse.

### ■ TESTABLAUF

#### 1. SCHRITT (PROBENINKUBATION)

Von den Kalibratoren, verdünnten Patientenserum, positiven und negativen Kontrollserum jeweils 100 µl in die dafür vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren. (Kalibratoren nicht verdünnen).

- \* Das Pipettieren sollte zügig durchgeführt werden, damit sich die Inkubationszeiten für die einzelnen Vertiefungen sich nicht allzu sehr unterscheiden.

Streifen mit Klebefolie abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.

#### 2. SCHRITT (WASCHEN)

Inhalt in den Vertiefungen absaugen oder auskippen. Mit Waschlösung füllen und vollständig absaugen oder auskippen. Insgesamt viermal waschen. Abschließend Streifen gegen Papierhandtücher ausklopfen, um die letzten Reste an Waschlösung zu entfernen. Bei Einsatz eines automatischen Waschgeräts viermal waschen.

- \* Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Waschzeiten und -bedingungen festlegt.
- \* Die Waschlösung sollte vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.

#### 3. SCHRITT (KONJUGATINKUBATION)

Gebrauchsfertige Konjugatlösung in eine Wanne geben. Mit einer Multikanalpipette 100 µl Konjugat in jede Vertiefung pipettieren. Mit Klebefolie abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.

#### 4. SCHRITT (WASCHEN)

Die Streifen wie im 2. SCHRITT beschrieben waschen.

## 5. SCHRITT (SUBSTRATINKUBATION)

Substratlösung in eine Wanne geben. Mit einer Multikanalpipette 100 µl in jede Vertiefung pipettieren.

\* Nicht die selbe Wanne wie jene für das Konjugat verwenden. Am besten eignet sich eine neue Einwegwanne, weil das Substrat leicht durch Metallionen oxidiert wird.

\* Ggf. in der Wanne übrig gebliebenes Substrat darf nicht in die Substratflasche zurückgeführt werden.

Mit Klebefolie abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.

## 6. SCHRITT (ABSTOPPEN)

Die Stopplösung in eine Wanne geben. Mit einer Multikanalpipette 100 µl in jede Vertiefung pipettieren.

### ■ PHOTOMETRIEREN

Die Extinktion jeder Vertiefung bei 450 nm messen. Bei Verwendung eines Photometers mit zwei Wellenlängen erfolgt die Extinktionsmessung bei 450 nm, die Referenzmessung bei 620 nm.

\* Die Vertiefungen sollten sofort nach dem Abstoppen photometriert werden.

\* Die Unterseite der Streifen muss sauber und trocken sein. Die Vertiefungen dürfen beim Photometrieren keine Luftblasen enthalten.

### ■ BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

$$\text{Arbiträre Einheiten} = \frac{A_{450}\langle\text{Probe}\rangle - A_{450}\langle\text{Kalibrator 1}\rangle}{(A_{450}\langle\text{Kalibrator 2}\rangle - A_{450}\langle\text{Kalibrator 1}\rangle)} \times 100$$

\*  $A_{450}$  bedeutet: Extinktion bei 450 nm

\* Da eine internationale Referenzpräparation für ANA nicht verfügbar ist, ist der Test in relativen arbiträren Einheiten kalibriert.

### ■ QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testansatz müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

$A_{450}$  vom Kalibrator-1:  $\leq 0,100$

$A_{450}$  vom Kalibrator-2:  $> 0,500$

Die positiven und negativen Kontrollseren müssen folgende Ergebnisse zeigen:

	Positivkontrolle	Negativkontrolle
ANA (U/ml)	>40	<21

Wird einer dieser Werte nicht erreicht, sind die Ergebnisse ungültig. Der Testlauf sollte wiederholt werden. Ehe der Testlauf wiederholt wird, sind folgende Parameter der Testdurchführung zu überprüfen:

- Inkubationstemperatur
- Inkubationszeiten
- Waschverfahren

## BEURTEILUNG DER ERGEBNISSE UND ERWARTETE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur der Orientierung. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Grenzwerte auf der Grundlage der von ihm betreuten Patientenpopulationen erstellt.

ANA (U/ml)	Beurteilung
< 21	Negativ für ANA
$\geq 21$	Positiv für ANA

Der oben aufgeführte Grenzwert wurde anhand ROC-Analysen mit 695 Seren von Blutspendern und Patienten mit Autoimmunerkrankungen erstellt.

### ■ GRENZEN DES VERFAHRENS

Wie bei anderen diagnostischen Verfahren, so sind die mit REAADS ANA TEST ermittelten Ergebnisse nur eine Hilfestellung bei der Diagnostik und nicht diagnostisch an sich zu werten.

## LEISTUNGSMERKMALE

### ■ KLINISCHE SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT

Erkrankung	Positive Proben	Positivrate
MCTD	55/56	98,2%
SLE	96/102	94,1%
SjS	44/46	95,7%
SSc	52/55	94,5%
PM/DM	18/27	66,7%
Normalkollektiv	2/38	5,3%%

MCTD: Mischkollagenose

SLE: systemischer Lupus erythematodes

SjS: Sjögren-Syndrom

SSc: Systemsklerose

PM/DM: Polymyositis/Dermatomyositis

### PRÄZISION (IN DER SERIE)

Bei 3 verschiedenen Proben, die mehr als 6mal in einem Ansatz getestet wurden, lag der VK jeder einzelnen Probe unter 10 %.

### ■ MESSBEREICH

Der Messbereich dieses Kits erstreckt sich von 5 U/ml bis 200 U/ml.

### ■ INTERFERENZEN

Hämoglobin (bis 470 mg/dl) und Bilirubin (bis 17,7 mg/dl) und Chylus (bis 2.490 Formazin-Einheiten) beeinträchtigen die Testergebnisse nicht. Stark hämolytische und stark lipämische Proben sollten aber vermieden werden.

## LITERATUR

1. Tsay, G.J. et al.: An immunoassay differentiating sera with antibodies to Sm alone, antibodies to Sm/RNP complex, and antibodies to RNP alone. *Arthritis & Rheum.* 30: 389-396, (1987).
2. Tojo, T. et al.: Diversity of autoantibodies and their clinical significance in systemic autoimmune diseases. *Medical immunology* 14: 761-766, (1987).
3. Sharp, G.C. et al.: Mixed connective tissue disease: an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Amer. J. Med.* 52: 148-152, (1972).
4. Query, C.C. et al.: A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* 57: 89-101, (1989).
5. Query, C.C. et al.: A human autoimmune protein associated with U1 RNA contains a region of Homology that is cross-reactive with retroviral p30gag antigen. *Cell* 51: 211-220, (1987).
6. Krapf, A.R., C.A. von Mühlen, F.E. Krapf, R.M. Nakamura, E. Tan, *Atlas of Immunofluorescent Autoantibodies*, Urban & Schwarzenberg, Baltimore, MD. , 1996.

## INDICACIONES

La prueba para AAN de MESACUP es un procedimiento inmunoenzimático (ELISA) para la determinación semicuantitativa de anticuerpos antinucleares patogénicos en suero humano. La prueba para AAN de MESACUP es para uso diagnóstico in vitro como ayuda en la determinación de ciertas enfermedades autoinmunes.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos antinucleares (AAN) son un grupo de autoanticuerpos dirigidos contra varios antígenos del núcleo celular, y algunos se consideran bastante útiles para el diagnóstico de ciertas enfermedades autoinmunes, como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo (EMTC), Síndrome de Sjögren (SS) y Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP). La Inmunofluorescencia Indirecta (II) se usa ampliamente para detectar los anticuerpos antinucleares. Debido a que con esta prueba se puede asumir la identidad del antígeno mediante la tinción de patrones, se puede obtener información sobre una diversidad de anticuerpos específicos. Por otro lado, la II puede ser inconveniente cuando se examina un número grande de muestras, y a veces carece de especificidad debido a las diferencias entre los reactivos, los operadores y los equipos de laboratorio.

La prueba para AAN de MESACUP utiliza el formato de ELISA para detectar anticuerpos antinucleares específicos que se presentan con frecuencia en pacientes con enfermedades autoinmunes. Esta prueba permite una interpretación objetiva de los resultados, ya que se expresan en unidades y se pueden examinar muchas muestras en lapsos breves.

## FUNDAMENTO

La prueba para AAN de MESACUP utiliza la tecnología de ELISA para medir anticuerpos antinucleares específicos; anti-RNP, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, Jo-1, CENP-B, Ribosomal-P, ADN e Histona presentes en suero. Se añaden calibradores y suero a pocillos revestidos con antígenos a fin de que los anticuerpos antinucleares reaccionen con los antígenos inmobilizados (incubación de las muestras). Después del lavado para remover cualquier proteína sérica libre, se añaden e incuban anticuerpos anti-inmunoglobulina IgG, IgA e IgM humana conjugados con enzima peroxidasa (incubación del conjugado). Luego de otro lavado se añade sustrato de peroxidasa (incubación del sustrato). Finalmente, se le añade una solución ácida a cada pocillo para detener la reacción enzimática y estabilizar el color. Los resultados se cuantifican mediante la medición fotométrica de la reacción y el gráfico de los resultados.

## RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

<Incubación: Muestra> (20-25° C) 60 min.	Añadir 100 µl de muestra diluida (1:101) a cada pocillo de la placa ↓ Lavado ↓
<Incubación: Conjugado> (20-25° C) 60 min.	Añadir 100 µl de solución del conjugado a cada pocillo ↓ Lavado ↓
<Incubación: Sustrato> (20-25° C) 30 min.	Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo ↓ Añadir 100 µl de solución de parada a cada pocillo ↓ Lectura de la absorbancia ↓ Interpretación de los resultados

## REACTIVOS Y ALMACENAJE

### 1) TIRAS DE MICROPOCILLOS

TIRAS DE MICROPOCILLOS (12 x 8 pocillos) revestidos con una mezcla de antígenos de proteínas recombinantes purificadas de Jo-1, RNP, SS-A, SS-B, CENP-B, Ribosomal P, U1 RNA transcripta in vitro y antígenos nativos purificados de SS-A, Sm, Scl-70, ADN e Histona. Las tiras desprendibles vienen en un sujetador, y están envasadas y selladas en un sobre de aluminio con material desecante, que las mantiene estables a temperaturas entre 2 y 8° C hasta la fecha de vencimiento en la etiqueta.

### 2) CALIBRADOR 1 (0 U/mL)

Un vial con 1.5 mL de Diluyente de la Prueba, que contiene azida de sodio al 0.1%. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### 3) CALIBRADOR 2 (100 U/mL)

Un vial con 1.5 mL de suero humano para control positivo de AAN con Diluyente de la Prueba, que contiene azida de sodio al 0.1%. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### 4) CONCENTRADO DEL CONJUGADO (101X)

Un vial con 300 µL de anticuerpos de cabra anti-IgG, IgA e IgM humanos conjugados con enzima peroxidasa (específicos para cadena pesada) concentrado a 101X. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento. Se incluye el frasco para la preparación de la solución del conjugado.

### 5) DILUYENTE DEL CONJUGADO

Un frasco con 24 ml de HEPES, Proclin 150 y BSA. Listo para usar. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### 6) DILUYENTE DE LA PRUEBA

Dos frascos con 50 mL de MOPS, Tween 20, suero bovino y azida de sodio al 0.1%. Listo para usar. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### 7) CONCENTRADO PARA EL LAVADO (10X)

Un frasco de 100 mL con PBS y Tween 20 concentrado a 10X. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### 8) SOLUCIÓN DEL SUBSTRATO

Un frasco de 20 mL con dihidrocloridato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina/peróxido de hidrógeno (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Listo para usar. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### 9) SOLUCIÓN DE PARADA

Un frasco de 20 mL con ácido sulfúrico a 1N. Listo para usar. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### 10) SUERO HUMANO PARA CONTROL POSITIVO

Un vial con 0.2 mL de suero humano para control positivo de AAN con azida de sodio al 0.1%. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### 11) SUERO HUMANO PARA CONTROL NEGATIVO

Un vial con 0.2 mL de suero humano para control negativo de AAN con azida de sodio al 0.1%. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

## PRECAUCIONES

- (1) Este producto es sólo para uso diagnóstico in vitro.
- (2) No use los componentes de la prueba después de sus fechas de vencimiento.
- (3) Evite el contacto de los reactivos con los ojos, piel y vestimenta. Si los reactivos entran en contacto con la piel, enjuáguese con abundante agua. El TMB contiene irritantes, mientras que la Solución de Parada consiste en ácido sulfúrico al 1N, que es venenoso y corrosivo.

- (4) El Calibrador 2 y los Controles positivo y negativo contienen suero humano en los cuales no se han detectado antígenos HB, HCV, HIV-1 y HIV-2. Sin embargo, ninguna prueba puede garantizar la ausencia de estos y otros agentes infecciosos. Estos reactivos, así como todas las muestras de pacientes, deben manipularse como material capaz de transmitir el SIDA, la hepatitis o cualquier otra enfermedad infecciosa.
- (5) El Calibrador 1, el Calibrador 2, el Control Positivo, el Control Negativo y el Diluyente de la Prueba contienen azida de sodio (0.1%) como preservante y deben manipularse con precaución: no ingerir o permita que entren en contacto con la piel o membranas mucosas. La azida de sodio puede reaccionar con el cobre o el plomo de los tubos de gasfitería y formar azidas metálicas explosivas. Por lo tanto, al verter por el desagüe los materiales que contienen azidas, siempre enjuague con abundante agua.
- (6) Algunos componentes de la prueba contienen materiales de origen animal. Aunque provienen de animales sin posibilidades de infectar, se deben usar y desechar estos componentes como si fueran capaces de infectar.
- (7) Use las Tiras de Micropocillos, el Conjugado y el Calibrador 2 con sus números de lote correspondientes. No sustituya con reactivos de otros lotes.
- (8) Deje que todos los reactivos adquieran temperatura ambiente (20-25 °C) antes de empezar la prueba.
- (9) No exponga los componentes a luz solar directa durante su almacenaje o durante la prueba.
- (10) Evite la contaminación microbiana o cruzada entre los reactivos y muestras.
- (11) Las temperaturas de incubación fuera del rango de la temperatura ambiente normal (20-25 °C), los períodos de incubación más cortos o prolongados, y las diluciones inexactas podrían producir resultados erróneos.
- (12) Los pocillos deben enjuagarse con la Solución de Lavado adecuadamente para evitar falsos positivos.
- (13) Use las pipetas con cuidado para evitar que las muestras o los reactivos formen espuma y causen contaminación cruzada en los pocillos.
- (14) Coloque todas las tiras desprendibles que no se usen inmediatamente dentro de la bolsa cerrándola herméticamente para evitar la absorción de humedad.
- (15) El Concentrado de Lavado podría volverse turbio a temperaturas entre 2 y 8 °C. Sin embargo, esto no va a producir resultados inconsistentes.
- (16) Los resultados que se obtengan con esta prueba para AAN sirven sólo de ayuda en el diagnóstico. El médico debe interpretar estos resultados conjuntamente con la historia del paciente, la evaluación clínica y otros procedimientos diagnósticos.

## **MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO PROVISTOS**

- Lectora para microplacas (longitud de onda: 450 nm, 620 nm/referencia)
- Micropipeta multicanal (p.ej. 100 µL - 300 µL) para dispensar el conjugado, el substrato y la solución de parada.
- Micropipeta unicanal (10 µL y 100 µL)
- Reservorio para reactivos
- Botella para lavado o instrumento para lavado automático
- Agua destilada o deionizada
- Probeta graduada de un litro para la preparación de la solución de lavado
- Microtubos para las diluciones de las muestras de los pacientes (p.ej. 1000 µL)
- Puntas de pipeta desechables
- Toallas de papel
- Recipiente y desinfectante
- Cubierta de placa

## PROCEDIMIENTO

### ■ PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Deje que todos los materiales adquieran temperatura ambiente (20-25 °C) antes de empezar la prueba.
- Tiras de Micropocillos: Desprenda el número de tiras requerido de su envase y colóquelas en el sujetador. Inmediatamente guarde y refrigere todas las tiras que no vaya a usar.
- Solución de Lavado: Prepare una dilución de 1:10 con el Concentrado de Lavado (p.ej. añada 100 mL del Concentrado de Lavado a 900 mL de agua destilada). Esta dilución se mantendrá estable durante 2 semanas a temperaturas entre 2 y 8 °C.
- Solución del Conjugado: Diluya el Reactivo del Conjugado antes de usarlo. Prepare la Solución del Conjugado diluyendo el Reactivo del Conjugado a 1:101 con el Diluyente del Conjugado. La Dilución del Conjugado debe usarse el mismo día de la prueba. Use un reservorio desechable para prevenir contaminación.
- No diluya el Calibrador 1, el Calibrador 2, el Diluyente de la Prueba, el Substrato ni la Solución de Parada, ya que vienen listos para usar.

### ■ PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Use muestras frescas de suero. Si requieren almacenaje, deben congelarse a -20 °C hasta un máximo de un mes; o a -70 °C por períodos más prolongados. Evite congelar y descongelar repetidas veces.
  - \* Si se almacenen las muestras a -20 °C por más de 6 meses, o se congelan y descongelan repetidas veces, podrían obtenerse resultados inespecíficos debido a la desnaturalización del IgG.
- Diluya cada suero del paciente a 1:101 añadiendo 10 µL de suero a 1 mL de Diluyente de la Prueba.
  - \* Las muestras diluidas se pueden almacenar hasta un máximo de 3 días bajo refrigeración.
  - \* El Diluyente de la Prueba podría formar un precipitado, pero esto no produce resultados inconsistentes.

### ■ PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

#### PASO 1. (INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS)

Con la pipeta multicanal, transfiera 100 µL de cada muestra diluida, así como los Controles Positivo y Negativo, dentro de los pocillos correspondientes. Añada los Calibradores directamente a los pocillos, ya que no es necesario diluirlos.

\* La incubación empieza desde el momento en que se transfieren las muestras a los pocillos, por lo que la transferencia con las pipetas se debe completar lo más rápidamente posible.

Cubra los pocillos con la cubierta de placa e incube durante 60 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).

#### PASO 2. (LAVADO)

Aspire o deseche el contenido de los pocillos. Llene cada pocillo con la Solución de Lavado, y luego aspire o deseche todo su contenido. Repita el lavado 4 veces. Golpee la placa sobre una toalla de papel a fin de que absorba cualquier resto de la Solución de Lavado. Si usa un instrumento de lavado automático, repita el lavado 4 veces.

\* Se recomienda que cada laboratorio confirme sus propios tiempos y procedimientos de lavado.

\* La Solución de Lavado se debe usar a temperaturas entre 20 y 25 °C.

#### PASO 3. (INCUBACIÓN DEL CONJUGADO)

Vierta el Reactivo del Conjugado dentro de un reservorio. Añada 100 µL de Reactivo del Conjugado a cada pocillo usando una pipeta multicanal. Cubra los pocillos con la cubierta de placa e incube durante 60 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).

#### PASO 4. (LAVADO)

Lave la microplaca siguiendo el procedimiento del PASO 2.

## PASO 5. (INCUBACIÓN DEL SUBSTRATO)

Vierta el Substrato dentro de un reservorio y transfiera 100 µL de Substrato a cada pocillo usando una pipeta multicanal.

- \* El reservorio debe ser diferente del que se usó para verter la solución del conjugado. Debe usarse un reservorio nuevo desechable, ya que el Substrato es fácilmente oxidizado por iones metálicos.
- \* Una vez que se vierta el Substrato en el reservorio, no debe regresarse a su frasco original.

Cubra los pocillos con la cubierta de placa e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).

## PASO 6. (REACCIÓN DE PARADA)

Vierta la Solución de Parada dentro de un reservorio. Transfiera 100 µL de la solución a cada pocillo usando una pipeta multicanal.

### ■ LECTURA

Lea la absorbancia de cada pocillo a 450 nm. Si se dispone de una lectora de placa de longitud de onda doble, coloque la longitud de onda a 450 nm y la referencia a 620 nm.

- \* La lectura se debe realizar lo más rápidamente posible después de detener la reacción.
- \* Antes de leer la placa, verifique que la parte inferior esté limpia y seca, y que la superficie del líquido dentro de los pocillos esté libre de burbujas.

### ■ CÁLCULO DEL RESULTADO

$$\text{Valor (U/ml)} = \frac{(A_{450}<\text{Muestra}> - A_{450}<\text{Calibrador 1}>)}{(A_{450}<\text{Calibrador 2}> - A_{450}<\text{Calibrador 1}>)} \times 100$$

- \*  $A_{450}$  es el valor de absorbancia a 450 nm.
- \* No se dispone de material de referencia internacional apropiado para la medición de anticuerpos antinucleares mediante ELISA; la prueba está calibrada en unidades relativas arbitrarias.

### ■ CONTROL DE CALIDAD

Cada prueba debe cumplir con los siguientes criterios:

$A_{450}$  del Calibrador 1:  $\leq 0.100$

$A_{450}$  del Calibrador 2:  $> 0.500$

Los Controles Positivo y Negativo deben dar los siguientes resultados:

	Control Positivo	Control Negativo
Valor AAN (U/ml)	>40	<21

Si no se cumplen, los resultados son inválidos y se debe repetir la prueba.

Antes de repetir la prueba, revise los siguientes procedimientos:

- Temperatura de incubación
- Tiempo de incubación
- Lavado

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y VALORES ESPERADOS

El propósito del siguiente cuadro sirve sólo como guía para la interpretación. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios criterios para la interpretación de resultados de acuerdo a sus poblaciones típicas.

Valor AAN (U/ml)	Interpretación
<21	Negativo para AAN
Mayor o igual a 21	Positivo para AAN

El valor para los AAN del cuadro fue determinado mediante análisis ROC usando 695 muestras de suero de sujetos con enfermedad autoinmune y de donantes de sangre normales.

### ■ LIMITACIONES

Al igual que otros procedimientos, los resultados que se obtengan con la prueba para AAN de MESACUP sirven sólo de ayuda en el diagnóstico y no deben ser interpretados por sí solos como diagnósticos.

## CARACTERÍSTICAS DE LA PRUEBA

### ■ ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD

Enfermedad	Muestras positivas/Total	% de positividad
EMTC	55/56	98.2%
LES	96/102	94.1%
SS	44/46	95.7%
ESP	52/55	94.5%
PM/DM	18/27	66.7%
Suero Normal	2/38	5.3%

EMTC: Enfermedad mixta del tejido conjuntivo

LES: Lupus eritematoso sistémico

SS: Síndrome de Sjögren

ESP: Esclerosis sistémica progresiva

PM/DM: Polimiositis/Dermatomiositis

### ■ PRECISIÓN

Se demostró la precisión analizando 3 muestras en sextuplicado. Se determinó la reproducibilidad analizando 3 muestras en 5 días distintos (día a día) y analizando 3 muestras de 3 lotes (lote a lote). Los valores del Coeficiente de Variación (CV) para precisión y reproducibilidad estuvieron debajo del 15% para cada muestra.

### ■ RANGO DE LA PRUEBA

El rango de esta prueba es de 5 U/mL a 200 U/mL.

### ■ SUSTANCIAS INTERFERENTES

La hemoglobina (hasta 470 mg/dL), la bilirrubina (hasta 17.7 mg/dL) y/o el quilo (hasta 2,490 unidades, de Formazine) no afectan el resultado de la prueba. Sin embargo, evite usar muestras con niveles altos de hemólisis o lipemia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tsay, G.J. et al.: An immunoassay differentiating sera with antibodies to Sm alone, antibodies to Sm/RNP complex, and antibodies to RNP alone. *Arthritis & Rheum.* 30: 389-396, (1987).
2. Tojo, T. et al.: Diversity of autoantibodies and their clinical significance in systemic autoimmune diseases. *Medical immunology* 14: 761-766, (1987).
3. Sharp, G.C. et al.: Mixed connective tissue disease: an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Amer. J. Med.* 52: 148-152, (1972).
4. Query, C.C. et al.: A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* 57: 89-101, (1989).
5. Query, C.C. et al.: A human autoimmune protein associated with U1 RNA contains a region of Homology that is cross-reactive with retroviral p30gag antigen. *Cell* 51: 211-220, (1987).
6. Krapf, A.R., C.A. von Mühlen, F.E. Krapf, R.M. Nakamura, E. Tan, *Atlas of Immunofluorescent Autoantibodies*, Urban & Schwarzenber, Baltimore, MD. , 1996.

**USO PREVISTO**

REAADS ANA TEST è un semi-quantitativo, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), per il rilevamento nel siero umano di anticorpi anti-Nucleari specifici per malattie. REAADS ANA TEST è previsto per uso diagnostico in vitro e come aiuto nella determinazione delle patologie autoimmuni.

**RIASSUNTO E SPIEGAZIONE**

Gli anticorpi anti-nucleo (ANA) sono autoanticorpi contro vari antigeni del nucleo cellulare ed alcuni di essi sono considerati molto utili per la diagnosi di malattie autoimmuni come Lupus Sistemico Eritematoso (SLE), Malattia mista del Tessuto Connettivo (MCTD), Sjögren's Syndrome (SjS), Sclerosi Sistemica Progressiva (SPS). L'immunofluorescenza indiretta (IF) è stata ampiamente usata per la ricerca degli anticorpi antinucleo. Poiché un certo antigene fornisce un determinato modello (pattern) di colorazione, ciò può fornire informazioni su una molteplicità di specificità anticorpali. D'altra parte, però, questo metodo non è conveniente quando si devono esaminare un gran numero di campioni, e la sua specificità diminuisce a causa delle differenze fra i reagenti, fra gli operatori e fra le attrezzature di laboratorio.

REAADS ANA TEST è un test in ELISA per la ricerca di anticorpi antinucleo specifici, che vengono spesso riscontrati in pazienti con malattie autoimmuni. Questo test rende possibile un giudizio obiettivo dal momento che i risultati sono espressi come valore Indice e permette l'esame di molti campioni in un breve periodo di tempo.

**PRINCIPIO**

REAADS ANA TEST misura anticorpi anti-Nucleari specifici per patologie, anti RNP, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, Jo-1, CENP-B, Ribosomal-P, anticorpi verso DNA ed Istoni presenti nel siero per ELISA. Calibratori e siero di paziente sono aggiunti ai pozzetti sensibilizzati con antigeni, permettendo agli anticorpi anti-Nucleari di reagire con gli antigeni immobilizzati (Incubazione del Campione). Dopo lavaggio per rimuovere ogni non legata proteina sierica, viene aggiunto un coniugato di anti IgG, IgA ed IgM umane a Horseradish perossidasi ed incubato (Incubazione del Coniugato). Dopo un altro lavaggio, il substrato per perossidasi viene aggiunto ed incubato (Incubazione del Substrato). Soluzione acida viene infine aggiunta ad ogni pozzetto per bloccare la reazione enzimatica e stabilizzare lo sviluppo del colore. Il dosaggio può essere quantificato misurando la reazione fotometrica e riportando i risultati su curva.

**BREVE DESCRIZIONE DEL METODO**

<Incubazione del Campione> (20-25 °C) 60 min.	Aggiungere 100µl di campione diluito (1:101) ad ogni pozzetto della piastra microtiter. ↓ Lavare ↓
<Incubazione del Coniugato> (20-25 °C) 60 min.	Aggiungere 100µl di Coniugato ad ogni pozzetto. ↓ Lavare ↓
<Incubazione del Substrato> (20-25 °C) 30 min.	Aggiungere 100µl di Substrato ad ogni pozzetto. ↓ Aggiungere 100µl di Sol. bloccante ad ogni pozzetto. ↓ Leggere l'assorbanza ↓ Interpretare il risultato

## REAGENTI E LORO CONSERVAZIONE

### 1) STRIPS DI POZZETTI MICROTITER

96 Pozzetti di piastre microtiter in Strips (8 x 12 pozzetti) coatati con antigene costituito con una miscela di proteine ricombinanti purificate Jo-1, RNP, SS-A, SS-B, CENP-B, Ribosomale P, U1RNA trascritto in vitro; proteine native purificate SS-A, Sm, Scl-70, DNA ed Istoni. Le strips frazionabili, contenute in un apposito alloggiamento e confezionate in busta di alluminio con materiale desiccante, sono stabili a 2-8°C. Le strips mantengono la loro stabilità per 60 giorni se conservate a 2-8°C una volta aperta e correttamente richiusa la busta.

### 2) CALIBRATORE 1 (0 U/ml)

Un flacone contenente 1.5ml di diluente del campione, con sodiazide 0.1%. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### 3) CALIBRATORE 2 (100 U/ml)

Un flacone contenente 1.5ml di siero umano di controllo positivo con diluente del campione con sodiazide 0.1%. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### 4) CONIUGATO CONCENTRATO (101x)

Un flacone contenente 0.3 ml di anticorpo in capra anti IgG, IgA ed IgM umane (specifico catene pesanti) coniugato con horseradish perossidasi, alla concentrazione 101X. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata. Viene fornito il flacone per preparare coniugato soluzione di lavoro.

### 5) DILUENTE DEL CONIUGATO

Un flacone contenente 24ml di HEPES, Proclin 150 ed albumina da siero bovino. Pronto all'uso. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### 6) DILUENTE DEL TEST

Un flacone contenente 50ml di MOPS, Tween 20, albumina da siero bovino e 0.1% sodioazide. Pronto all'uso. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### 7) SOLUZIONE DI LAVAGGIO CONCENTRATA (10x)

Un flacone contenente 100 ml di PBS e Tween 20, concentrato 10x. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### 8) SUBSTRATO

Un flacone contenente 20ml of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride /hydrogen peroxide (TMB/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### 9) SOLUZIONE BLOCCANTE

Un flacone contenente 20ml di 1.0N acido solforico. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### 10) SIERO DI CONTROLLO POSITIVO

Un flacone contenente 0.2 ml di siero umano controllo positivo per ANA con 0.1% sodioazide. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### 11) SIERO DI CONTROLLO NEGATIVO

Un flacone contenente 0.2 ml di siero umano controllo negativo per ANA con 0.1% sodioazide. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

## PRECAUZIONI PER L'USO

- (1) Questo prodotto è per solo uso diagnostico in vitro.
- (2) Non usare i componenti del kit oltre la data di scadenza riportata per ognuno.
- (3) Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi, la pelle e gli indumenti. Se i reagenti vengono a contatto con la pelle, lavare immediatamente con acqua in abbondanza. TMB contiene sostanze irritanti e la Soluzione bloccante è composta da acido solforico 1N, velenoso e corrosivo.

- (4) Calibratore 2, Controllo Positivo e Negativo e Diluente del test derivano da siero umano negativo per l'antigene HBs, gli anticorpi HIV (HIV-1 ed HIV-2) e gli anticorpi anti HCV. Peraltro nessun test può garantire in maniera certa l'assenza di questi od altri agenti infettivi, dunque i reagenti e tutti i campioni dei pazienti devono essere trattati come potenzialmente capaci di trasmettere malattie infettive note (AIDS, HCV etc) o sconosciute.
- (5) Calibratore 1, Calibratore 2, Controllo Positivo, Controllo Negativo e Diluente del test contengono come conservante 0.1% sodio azide, dunque essi devono essere maneggiati con cura (non ingerire o far venire a contatto con mucose o pelle). La sodioazide può reagire con rame o piombo per formare azidi metalliche esplosive. Quindi, diluire con abbondante acqua prima di smaltire.
- (6) Alcune componenti dei kits contengono materiali di origine animale, derivanti da animali non infetti. Queste componenti dovrebbero essere trattate come pericolose per la salute sia al momento dell'uso che a quello dello smaltimento.
- (7) Per effettuare il test devono essere usati componenti (Strips di pozzetti, Coniugato e Calibratore 2) contrassegnati dallo stesso numero di lotto. Non sostituire singoli reagenti con reagenti provenienti da altri kits.
- (8) Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima di iniziare il test.
- (9) Non esporre il kit alla diretta luce del sole durante l'esecuzione del test e la conservazione.
- (10) Evitare inquinamento batterico e cross contaminazione dei reagenti o dei campioni.
- (11) Tempi di incubazione al di sopra o al di sotto della temperatura ambiente (20-25°C), periodi di incubazione più brevi o lunghi e non precise diluizioni possono dare comportare errori nei risultati.
- (12) I pozzetti devono essere lavati con Soluzione di Lavaggio accuratamente per evitare false positività.
- (13) Pipettare accuratamente senza provocare schiuma ogni campione e reagente per evitare cross contaminazione da pozzetto a pozzetto.
- (14) Se non immediatamente richiesto, tutte le strips devono essere riposte nella busta ed accuratamente sigillate per evitare assorbimento di umidità.
- (15) La Soluzione concentrata di Lavaggio può divenire torbida a 2-8°C, ma questo non causa danni al test.
- (16) Il valore di anticorpi anti ANA ottenuto da questo test è solo un aiuto per la diagnosi. Ogni medico deve interpretare i risultati alla luce della storia clinica del paziente, delle osservazioni e di ogni altra indagine diagnostica.

## **MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI**

- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda : 450nm, 620 nm/riferimento)
- Micropipetta multicanale (100µl – 300µl)
- Micropipetta a singolo canale (10µl & 100µl)
- Flaconi per reagenti
- Lavatore automatico o bottiglia per lavaggio
- Acqua deionizzata o distillata
- Cilindri graduati da 1 litro per la preparazione della Soluzione di Lavaggio
- Provette per la diluizione dei campioni dei pazienti (1000µl )
- Puntali usa e getta per la micropipette
- Carta
- Catinella e disinfettante
- Coperchio per piastra microtiter

## **PROCEDURA**

### **■ PREPARAZIONE DEI REAGENTI**

- Prima dell'uso portare tutti i materiali necessari al test a temperatura ambiente (20-25°C).
- Strips di micropozzetti: Rimuovere i pozzetti richiesti e piazzarli in apposito alloggio. Riporre prontamente nella busta le strips non richieste per la corretta conservazione refrigerata.
- Soluzione di Lavaggio: La Soluzione concentrata deve essere diluita prima dell'uso 1:10 ( ad es. aggiungendo 100ml di Soluzione concentrata a 900ml di acqua distillata). La Soluzione diluita è stabile per 2 settimane a 2-8°C.

- Coniugato: Il Coniugato deve essere diluito prima dell'uso, 1:101, con Diluente del Coniugato. La soluzione di Coniugato diluita deve essere usata entro un giorno. Usare flaconi usa e getta per evitare contaminazioni.
- Non diluire il Calibratore-1, Calibratore-2, il Diluente del test, Substrato e Soluzione bloccante che sono pronti all'uso.

## ■ PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Usare sieri freschi di paziente. Se vi è necessità di conservazione, i sieri possono essere aliquotati e conservati congelati a -20 °C fino ad un mese, a -70 °C per più lunghi periodi. Non ripetere congelamenti e scongelamenti.
  - \* In caso di conservazione a -20 °C per più di 6 mesi o ripetuti congelamenti e scongelamenti, risultati non specifici possono essere ottenuti in conseguenza di denaturazione delle IgG.
- Diluire ogni siero di paziente 1: 101 aggiungendo 10µl di siero a 1ml Diluente del Test.
  - \* I campioni diluiti devono essere usati entro il terzo giorno se conservati a 4 °C.
  - \* Il Diluente del test può formare precipitati che non causano inconvenienti nei risultati.

## ■ PROCEDURA DEL TEST

### FASE 1. (INCUBAZIONE DEL CAMPIONE)

Pipettare 100µl di ognuno dei campioni diluiti, dei Controlli Positivo e Negativo in pozzetti di piastre microtiter. Aggiungere i Calibratori direttamente nei rispettivi pozzetti. (Non diluire i Calibratori).

- \* L'incubazione inizia quando il campione viene pipettato nel pozzetto. L'operazione deve essere completata nel più breve tempo possibile.

Coprire i pozzetti con un coperchio adesivo ed incubare a temperatura ambiente (20-25 °C) per 60 minuti.

### FASE 2. (LAVAGGIO)

Aspirare o scartare il contenuto dei pozzetti. Riempire ogni pozzetto con Soluzione di Lavaggio, quindi aspirare completamente o scartare il contenuto. Ripetere questa operazione di lavaggio 4 volte. Sbattere la micropiastra su un pezzo di carta per rimuovere ogni residuo di Soluzione di Lavaggio. Quando viene usato un lavatore automatico, lavare 4 volte.

- \* Si raccomanda di stabilire per ogni laboratorio gli appropriati tempi di lavaggio e le altre condizioni.
- \* La Soluzione di Lavaggio deve essere usata a 20-25 °C.

### FASE 3. (INCUBAZIONE DEL CONIUGATO)

Versare la Soluzione di Coniugato in un flacone. Aggiungere 100µl del Coniugato ad ogni pozzetto con micropipetta multicanale. Coprire i pozzetti con un coperchio sigillante ed incubare a temperatura ambiente (20-25 °C) per 60 minuti.

### FASE 4. (LAVAGGIO)

Lavare la micropiastra come nella Fase 2 precedentemente descritta.

### FASE 5. (INCUBAZIONE DEL SUBSTRATO)

Versare il Substrato in un flacone. Aggiungere 100µl del Substrato ad ogni pozzetto con micropipetta multicanale.

- \* Questo flacone deve essere diverso da quello usato per la Soluzione di Coniugato. Un nuovo flacone usa e getta deve essere usato, dato che il substrato tende facilmente ad essere ossidato da ioni metallo.
- \* Il Substrato una volta versato nel flacone non dovrebbe essere riportato nella bottiglia.

Coprire i pozzetti con un coperchio adesivo ed incubare a temperatura ambiente (20-25 °C) per 30 minuti.

### FASE 6. (REAZIONE BLOCCANTE)

Versare Soluzione Bloccante in un flacone. Aggiungere 100µl della soluzione ad ogni pozzetto con una micropipetta multicanale.

## ■ LETTURA

Leggere l'assorbanza di ogni pozzetto a 450nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, regolare la lunghezza d'onda per il test a 450nm ed il riferimento a 620nm.

- \* La lettura deve essere fatta prima possibile una volta bloccata la reazione.
- \* Prima della lettura della micropiastra, assicurarsi che il fondo della stessa sia pulito ed asciutto, e che non siano presenti sulla superficie del liquido contenuto nei pozzetti bolle d'aria.

## ■ CALCOLO DEI RISULTATI

$$\text{Val.Unità (U/ml)} = \frac{(A_{450}\langle\text{Campione}\rangle - A_{450}\langle\text{Calibratore 1}\rangle)}{(A_{450}\langle\text{Calibratore 2}\rangle - A_{450}\langle\text{Calibratore 1}\rangle)} \times 100$$

\*A<sub>450</sub> è l'abbreviazione del valore di assorbanza a 450 nm.

\*Non è disponibile un appropriato materiale di riferimento internazionale per misurare gli anticorpi anti nucleari per ELISA; il dosaggio è calibrato in unità arbitrarie relative.

## ■ CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni dosaggio dovrebbe rispondere ai seguenti criteri.

A<sub>450</sub> del Calibratore1: ≤0.100

A<sub>450</sub> del Calibratore2 >0.500

I Controlli Positivo e Negativo devono dare i seguenti risultati:

	Controllo Positivo	Controllo Negativo
Anti-ANA valore (U/ml)	>40	<21

Se ognuno di questi dati non è rispettato, i risultati non sono validi ed il dosaggio deve essere ripetuto.

Prima della ripetizione del dosaggio, verificare i seguenti parametri.

- Temperatura di Incubazione
- Tempi di Incubazione
- Lavaggi

## INTERPRETAZIONE DEL TEST E VALORI ATTESI

Ciò che segue deve essere inteso solo come una guida all'interpretazione. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i propri criteri per l'interpretazione del test basandosi sui campioni di popolazione normalmente incontrati.

Anti-ANA valore (U/ml)	Interpretazione
<21	Negativo per Anticorpi Anti-ANA
Più grande di o uguale a 21	Positivo per Anticorpi Anti-ANA

I valori ANA sopra riportati sono stati determinati per analisi ROC con 695 campioni di siero di malattie autoimmuni e donatori di sangue sani.

## ■ LIMITAZIONI

Come con le altre procedure diagnostiche, i risultati ottenuti con REAADS TEST ANA servono solo come aiuto nella diagnosi e non dovrebbero essere considerati di per sé diagnostici.

## PRESTAZIONI CARATTERISTICHE

### ■ SPECIFICITA' CLINICA E SENSIBILITA'

Malattia	Campione	Percent. di Positività
MCTD	55/56	98.2%
SLE	96/102	94.1%
SjS	44/46	95.7%
SSc	52/55	94.5%
PM/DM	18/27	66.7%
Siero Normale	2/38	5.3%

MCTD: malattia mista del tessuto connettivo

SLE: lupus sistemico eritematoso

SjS: sindrome di Sjogren

SSc: sclerosi sistemica

PM/DM: polimiosite/dermatomiosite

### ■ RIPRODUCIBILITA' (INTRA-ASSAY)

Quando 3 differenti campioni sono stati testati ripetutamente più di 8 volte, CV di ogni campione è stato inferiore al 10 %.

### ■ RANGE DEL DOSAGGIO

Il range del dosaggio di questo kit è da 5U/ml a 200U/ml.

### ■ SOSTANZE INTERFENTI

Emoglobina (fino a 470 mg/dl), Bilirubina (fino a 17.7mg/dl) e/o chilo (fino a 2,490 unità come Formazine) non influenzano i risultati del test, ma si eviti di usare campioni altamente emolizzati o lipemici

### BIBLIOGRAFIA

1. Tsay, G.J. et al.: An immunoassay differentiating sera with antibodies to Sm alone, antibodies to Sm/RNP complex, and antibodies to RNP alone. *Arthritis & Rheum.* 30: 389-396, (1987).
2. Tojo, T. et al.: Diversity of autoantibodies and their clinical significance in systemic autoimmune diseases. *Medical immunology* 14: 761-766, (1987).
3. Sharp, G.C. et al.: Mixed connective tissue disease: an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Amer. J. Med.* 52: 148-152, (1972).
4. Query, C.C. et al.: A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* 57: 89-101, (1989).
5. Query, C.C. et al.: A human autoimmune protein associated with U1 RNA contains a region of Homology that is cross-reactive with retroviral p30gag antigen. *Cell* 51: 211-220, (1987).
6. Krapf, A.R., C.A. von Mühlen, F.E. Krapf, R.M. Nakamura, E. Tan, *Atlas of Immunofluorescent*
7. *Autoantibodies*, Urban & Schwarzenberg, Baltimore, MD. , 1996.

\*\*The following symbols are used on the label.

\*\*Les symboles suivants ont été utilisés sur l'étiquette

\*\*Die folgenden Symbole finden Sie auf dem Etikett

\*\*En las etiquetas se usan los siguientes símbolos

\*\*I seguenti simboli sono usati sulle etichette.



For in vitro diagnostic use  
Dispositif médical de diagnostic in vitro  
Für in-vitro Diagnostik  
Para uso diagnóstico in vitro  
Per uso diagnostico in vitro



Catalogue number  
Référence du catalogue  
Artikelnummer  
Número de catálogo  
Numero di catalogo



Lot  
Code du lot  
Charge  
Lote



See instructions for use  
Consulter les instructions d'utilisation  
Siehe Packungsbeilage  
Ver instrucciones de uso  
Vedi Istruzioni per l'uso



Use by  
Utiliser jusque  
Haltbarkeit  
Temperatura de uso  
Usa da



Store at 2 – 8 °C  
Limites de température : 2 à 8 °C  
Lagerung bei 2 – 8 °C  
Conservar a 2 – 8 °C  
Conservare a 2 – 8 °C



Manufactured by  
Fabricant  
Hersteller  
Fabricado por  
Prodotto da



Authorized Representative  
Mandataire dans la Communauté européenne  
Bevollmächtigter  
Representane Autorizado  
Rappresentante Autorizzato

**EC REP**

MT Promedt Consulting GmbH  
Altenhofstrasse 80  
D-66386 St. Ingbert / Germany

**Manufactured for:**

Corgenix, Inc.  
11575 Main Street, Suite 400  
Broomfield, Colorado 80020 USA

**REAADS**<sup>®</sup> is a registered trademark of Corgenix, Inc.

© 2005, Corgenix, Inc

10930 03  
Effective: 2006-09-27

