

READS anti-SS-A

ELISA Test Kit

Cat. No. 10870: 96 wells
Cat. No. 10870: 96 puits
Art.-Nr. 10870: 96 Auftragsstellen
Cat. No. 10870: 96 pocillos
Cat. n. 10870: 96 pozzetti

Corgenix, Inc.

11575 Main Street, Suite 400, Broomfield, Colorado 80020 USA
Tel: 303-457-4345 Fax : 303-457-4519 www.corgenixonline.com

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

| | |
|---|----|
| English..... | 1 |
| Français..... | 7 |
| Deutsch..... | 13 |
| Español..... | 19 |
| Italiano..... | 25 |
| | |
| Symbols/Symboles/Symbole/Símbolos /Simboli..... | 31 |

English

INTENDED USE

The REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit is semi-quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of anti-SS-A/Ro antibodies in human serum. The REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit is intended for in vitro diagnostic use as an aid in the determination of certain autoimmune diseases.

SUMMARY AND EXPLANATION

SSA antibodies are ENA antibodies present in high frequency (88-96%) in the sera of patients with Sjögren's Syndrome (SS) and SLE (24-60%). SSA antibodies are also sometimes found in patients with Rheumatoid Arthritis, Myositis and Scleroderma. SSB antibodies are ENA antibodies present in high frequency (71-87%) in Sjögren's Syndrome and in lower frequency in SLE (9-35%). It has been confirmed that the SSA and SSB antibodies are identical with anti-Ro and anti-La respectively. SSB antibodies are frequently associated with SSA antibodies and are rarely detected alone. SSB antibodies are seen almost exclusively in women; and, the presence of both SSA and SSB antibodies in mothers and infants are associated with skin lesions, neonatal lupus and congenital heart block.

The REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit is for measuring specifically with high sensitivity, anti-SS-A/Ro antibodies present in the serum by ELISA.

PRINCIPLE

The REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit measures anti-SS-A/Ro antibodies present in the serum by ELISA. Calibrators and patient serum are added to microwell coated with SS-A antigens, allowing anti-SS-A/Ro antibodies to react with the immobilized antigen (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 calculating 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) SS-A MICROWELL STRIPS

96 wells MICROWELL STRIPS (12 x 8 wells) coated with antigen produced from recombinant purified proteins, 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 (0U/ml)

Two vials containing 1.5 ml of Assay Diluent including 0.1% sodium azide. Ready to use, make no further dilution. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

3) CALIBRATOR 2 (100U/ml)

Two vials containing 1.5 ml each of anti-SS-A antibody positive human serum with Assay Diluent including sodium azide. Ready to use, make no further dilution. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

4) CONJUGATE REAGENT

One vial containing 15 ml of horseradish peroxidase conjugated goat anti-human IgG, IgA and IgM (heavy chain specific), HEPES, Proclin 150 and BSA. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

5) ASSAY DILUENT*

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

6) 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.

7) SUBSTRATE SOLUTION*

One 20 ml bottle containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride/hydrogen peroxide (TMB/H₂O₂). Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

8) STOP SOLUTION*

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

9) POSITIVE CONTROL SERUM

One vial containing 0.2 ml of anti-SS-A antibody positive human serum with 0.1% sodium azide. Stable at 2-8°C

10) NEGATIVE CONTROL SERUM

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

*Those reagents can also be used for REAADS anti-RNP ELISA Test Kit, REAADS anti-Sm ELISA Test Kit, REAADS anti-SS-B ELISA Test Kit, REAADS anti-Scl-70 ELISA Test Kit, REAADS anti-Jo-1 ELISA Test Kit, and REAADS anti-CENP-B ELISA Test Kit.

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 has not been 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 ziplock 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 SS-A antibodies value 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.
- Do not dilute Calibrator 1, Calibrator 2, Conjugated Reagent, 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 denaturation.
- Dilute each patient serum 1:101 by adding 10µl of serum to 1ml of Assay Diluent.
*Diluted samples must be used within a day.
*Diluted samples can be also used for REAADS anti-RNP ELISA Test Kit, REAADS anti-Sm ELISA Test Kit, REAADS anti-SS-B ELISA Test Kit, REAADS anti-Scl-70 ELISA Test Kit, REAADS anti-Jo-1 ELISA Test Kit, and REAADS anti-CENP-B ELISA Test Kit.
* 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

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

*A₄₅₀ is abbreviation of absorbance value at 450 nm.

*An international reference material for anti-SS-A/Ro antibodies is not available. The assay is calibrated in relative arbitrary units.

■ QUALITY CONTROL

Each assay result should meet the following criteria.

A₄₅₀ of Calibrator1 : ≤0.100

A₄₅₀ of Calibrator2 : ≥0.500

The Positive and Negative Controls must give the following results:

| | | |
|------------------------|------------------|------------------|
| | Positive Control | Negative Control |
| Anti-SS-A value (U/mL) | > 100 | < 10 |

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 VALUE

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-SS-A value (U/mL) | Interpretation |
| < 10 | Negative for anti-SS-A Ab |
| Greater than or equal to 30 | Positive for anti-SS-A Ab |

If unit value within 10-30 is calculated, passage of clinical features and results of any other tests should be carefully observed.

■ LIMITATIONS

As with other diagnostic test procedures, the results obtained with the READS anti-SS-A ELISA Test Kit 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 | 18/34 | 52.9% |
| SLE | 31/70 | 44.3% |
| SjS | 85/132 | 64.4% |
| SSc | 12/68 | 17.6% |
| Normal Serum | 0/167 | 0.0% |

MCTD: Mixed connective tissue disease

SLE: Systemic lupus erythematosus

SjS: Sjögren's syndrome

Scs: 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 5 U/ml to 300 U/ml.

■ INTERFERING SUBSTANCES

Hemoglobin (up to 480 mg/dl), Bilirubin (up to 20.0 mg/dl), chyle (up to 2,780 unit as Formazine) and/or Rheumatoid Factor (up to 520 IU/ml) are not affective on the assay result, but avoid using highly hemolysed samples or highly lipemic samples.

REFERENCES

1. Alspaugh, M. A., Tan, E. M.: Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 55: 1067 - 1073, (1975).
2. Mattioli, M., Reichlin, M: Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum.* 25: 419-429, (1974).
3. St. Clair, E. W. et al.: Quantitative immunoassay of ant-La antibodies using purified recombinant La antigen. *Arthritis and Rheum.* 31: 506-514, (1988).
4. Paxton, H. et al.: Evaluation of the RheumaStrip ANA profile test: a rapid test strip procedure for simultaneously determining antibodies to autoantigens U1-Ribonucleoprotein (U1-RNP), Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, and to Native DNA. *Clin. Chem.* 36/5: 792-797, (1990).
5. Deutscher, S. L. et al.: Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9479-9483, (1988).

Français

BUT DU DOSAGE

Le REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit est une trousse de dosage semi-quantitative ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) pour la détection d'anticorps anti-SS-A/Ro dans le sérum humain. Le but du REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit est situé dans le diagnostic in vitro comme moyen de diagnostic différentiel de certaines maladies pemphigus.

RESUME ET EXPLICATION

Des anticorps SSA sont des anticorps ENA qui sont très fréquents (88-96%) dans les sérums de patients avec le syndrome de Sjögren (SS) et avec SLE (24-60%). Parfois, des anticorps SSA se trouvent également dans des patients avec l'arthrite rhumatoïde, la Myosite et le Scléroderme. Des anticorps SSB sont des anticorps ENA qui sont très fréquents (71-87%) dans le Syndrome de Sjögren et moins fréquents dans le SLE (9-35%). Il a été confirmé que les anticorps SSA et SSB sont respectivement identiques à l'anti-Ro et à l'anti-La. Souvent les anticorps SSB sont associés aux anticorps SSA et ils ne sont détectés seuls que rarement. Les anticorps SSB se trouvent presque exclusivement dans des femmes; et la présence des anticorps SSA et SSB dans des mères et des enfants est associée à des lésions de la peau, au lupus néonatal et au bloc cardiaque congénital.

La trousse REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit permet de détecter par méthode ELISA les anticorps anti-SS-A/Ro présent dans le sérum avec une sensibilité importante.

PRINCIPE DU TEST

La trousse REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit permet de mesurer par méthode ELISA la concentration des anticorps anti-SS-A/Ro présents dans le sérum. Des calibrateurs et des sérums de patients sont ajoutés dans des micro-puits sensibilisés avec SS-A. Les anticorps anti-SS-A/Ro vont se lier aux molécules de SS-A 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 (chaîne γ), 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 pour une période supplémentaire (Étape d'incubation du substrat). 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 calculant des résultats.

PROTOCOLE SIMPLIFIE

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

REACTIFS FOURNIS ET STOCKAGE

1) MICRO PLAQUE

12 Barrettes de 8 micropuits sensibilisés avec de l'antigène fait de protéines purifiées recombinantes, les bandes de séparation emballées dans un porte-bandes et cachetées dans une enveloppe de papier aluminium avec du dessiccant, sont stables à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

2) CALIBRATEUR 1 (0U/mL)

Deux flacons avec 1,5 mL du diluant sérum comprenant 0,1% d'azide sodium. Prêt à l'emploi, ne plus diluer. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

3) CALIBRATEUR 2 (100U/mL)

Deux flacons avec 1,5 mL de sérum humain positif d'anticorps anti-SS-A avec du diluant sérum comprenant de l'azide de sodium. Prêt à l'emploi, ne plus diluer. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

4) CONJUGUE

Un flacon avec 15 mL Anticorps de chèvre anti-IgG, IgA et IgM (heavy chain specific) humaine, couplé à de la peroxydase, HEPES, Proclin 150 et de l'albumine bovine. Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration.

5) DILUANT SERUM*

Deux flacons avec 50 mL de PBS, de Tween 20 et 0,1% d'azide sodium. Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration.

6) SOLUTION DE LAVAGE (10X)*

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

7) SUBSTRAT*

Un flacon avec 20 mL de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride/peroxide hydrogène (TMB/H₂O₂). Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

8) SOLUTION D'ARRET*

Acide sulfurique 1N (1X20 mL). Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

9) CONTROLE POSITIF

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

10) CONTROLE NEGATIF

Un flacon avec 0,2 mL de sérum humain négatif d'anticorps anti-Scl-70 avec 0,1% d'azide de sodium. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

* Ces réactifs peuvent être utilisés pour REAADS anti-RNP ELISA Test Kit, REAADS anti-Sm ELISA Test Kit, REAADS anti-SS-B ELISA Test Kit, REAADS anti-Scl-70 ELISA Test Kit, REAADS anti-Jo-1 ELISA Test Kit, and REAADS anti-CENP-B ELISA Test Kit.

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) Le Calibrateur 2, le Contrôle Positif et le Contrôle Négatif 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), le contrôle positif, le 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 trousse.
- (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) Éviter 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'anticorps SS-A 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) for dispensing conjugate, substrate, and stop solution.
- 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
- Eprouvettes 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 : Le tampon de lavage doit être dilué avant emploi. Diluer la solution concentrée en ajoutant 900 mL d'eau distillée à 100 mL de tampon de lavage 10X. Cette solution est stable 15 jours à 2-8°C.
- Ne pas diluer les Calibrateurs (1&2), Conjugué, 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.
 - *Les échantillons dilués doivent être utilisés le jour même.
 - *Les échantillons dilués peuvent être également utilisés pour REAADS anti-RNP ELISA Test Kit, REAADS anti-Sm ELISA Test Kit, REAADS anti-SS-B ELISA Test Kit, REAADS anti-Scl-70 ELISA Test Kit, REAADS anti-Jo-1 ELISA Test Kit, and REAADS anti-CENP-B ELISA Test Kit.
 - * 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 et incuber à température ambiante (20-25°C) pendant 60 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°C).

PHASE 3. (CONJUGATE INCUBATION)

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°C) 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. (ARRÊT 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

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

*DO_{450 nm} est la valeur de l'absorbance à 450 nm.

*Il n'y a pas de données de référence internationales pour des anticorps anti-SS-A/Ro; le test est calibré en unités relativement arbitraires.

■ VALIDATION DES RESULTATS

Pour valider le test, tenir compte des indications suivantes :

La D.O_{450 nm} du Calibrateur 1 ne doit pas être ≤0,100.

La D.O_{450 nm} du Calibrateur 2 doit être supérieure ≥0,500

Les Contrôles Positifs et Négatifs doivent donner les résultats suivants:

| | Contrôle Positif | Contrôle Négatif |
|-------------------------------|------------------|------------------|
| Anti-SS-A valeur index (U/mL) | > 100 | < 10 |

Si une de ces conditions n'est pas remplie, les résultats sont non valables et le test doit être répété.

Avant de répéter le test, vérifier la procédure suivante.

- 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.

| Anti-SS-A (U/mL) | Interprétation |
|------------------|----------------------------|
| < 10 | Négatif pour les Anti-SS-A |
| ≥ 30 | Positif pour les Anti-SS-A |

Pour des valeurs comprises entre 10 et 30, il convient d'examiner les résultats d'autres tests et le tableau clinique.

■ LIMITATIONS

Comme dans d'autres procédures de test diagnostiques, les résultats obtenus avec le READS anti-SS-A ELISA Test Kit 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 positif |
|--------------|---------------------|----------------|
| MCTD | 18/34 | 52,9% |
| SLE | 31/70 | 44,3% |
| SjS | 85/132 | 64,4% |
| SSc | 12/68 | 17,6% |
| Sérum normal | 0/167 | 0,0% |

MCTD: Les connectivites mixtes

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 5 U/mL à 300 U/mL.

■ INTERFERENCES

L'Hémoglobine (jusque 480mg/dL), la Bilirubine (jusque 20,0 mg/dL), le chyle (jusque 2780 unités comme Formazine) et/ou le Facteur Rheumatoïde (jusque 520 IU/mL) n'influencent pas le résultat du test, mais éviter d'utiliser des échantillons très hémolysés ou lipémiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alspaugh, M. A., Tan, E. M.: Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 55: 1067 - 1073, (1975).
2. Mattioli, M., Reichlin, M: Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum.* 25: 419-429, (1974).
3. St. Clair, E. W. et al.: Quantitative immunoassay of ant-La antibodies using purified recombinant La antigen. *Arthritis and Rheum.* 31: 506-514, (1988).
4. Paxton, H. et al.: Evaluation of the RheumaStrip ANA profile test: a rapid test strip procedure for simultaneously determining antibodies to autoantigens U1-Ribonucleoprotein (U1-RNP), Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, and to Native DNA. *Clin. Chem.* 36/5: 792-797, (1990).
5. Deutscher, S. L. et al.: Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9479-9483, (1988).

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit ist ein semi-quantitativer Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von SS-A/Ro-Autoantikörpern in Humanserum. Der REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit dient zum Einsatz *in-vitro* als Hilfestellung bei der diagnostischen Abklärung gewisser Autoimmunerkrankungen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

SS-A-Autoantikörper gehören zu den Autoantikörpern gegen ENA (Extrahierbare Nukleäre Antigene). Sie sind in hoher Frequenz (88-96%) in Seren von Patienten mit Sjögren-Syndrom (SjS) und SLE (24-60%) vorhanden. SS-A-Autoantikörper können auch bei anderen Kollagenosen nachgewiesen werden, wie Rheumatoide Arthritis, Myositis und Progressive Systemsklerose. SS-B-Autoantikörper gehören ebenfalls zu den ENA-Autoantikörpern. Sie kommen in hoher Frequenz beim Sjögren-Syndrom (71-87%) und seltener beim SLE (9-35%) vor. SS-A-Autoantikörper sind identisch mit Ro-Autoantikörpern, SS-B-Autoantikörper mit La-Autoantikörpern. SS-B-Autoantikörper kommen häufig zusammen mit SS-A-Autoantikörpern vor. Sie werden selten allein nachgewiesen. SS-B-Autoantikörper werden nahezu ausschließlich bei Frauen beobachtet; zusammen mit SS-A-Autoantikörpern sind sie bei Schwangeren und Kleinkindern mit Hautläsionen, neonatalem Lupus und kongenitalem AV-Block assoziiert.

Der REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit ist ein sehr sensitiver ELISA zum Nachweis von SS-A/Ro-Autoantikörpern im Humanserum.

TESTPRINZIP

Mit REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit werden Autoantikörper gegen SS-A/Ro in Serum mittels ELISA bestimmt. Kalibratoren und Patientenserum werden den mit SS-A-Antigen beschichteten Vertiefungen in einer Mikrotiterplatte hinzugefügt. Im Folgenden reagieren die Autoantikörper mit dem Antigen 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 berechnend 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 |

REAGENZIIEN UND IHRE LAGERUNG

1) MIKROTITERSTREIFEN

12 Mikrotiterstreifen mit jeweils 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit rekombinatem SS-A-Protein. 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)

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

3) KALIBRATOR 2 (100 U/ml)

Ein Fläschchen mit jeweils 1,5 ml Humanserum, positiv für SS-A-Autoantikörper, und Probendiluent. Enthalten 0,1% Natriumazid. Gebrauchsfertig. Nicht verdünnen! Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

4) KONJUGAT

Ein Fläschchen (15 ml) mit Meerrettichperoxidase markierten polyklonalen Ziegenantikörpern gegen Human-IgG, -IgA und -IgM (schwere Ketten-spezifisch), HEPES, Proclin 150 und BSA. Gebrauchsfertig. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

5) PROBENDILUENT*

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

6) KONZENTRIERTE WASCHLÖSUNG (10X)*

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

7) SUBSTRATLÖSUNG*

Eine Flasche (20 ml) mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid/Wasserstoffperoxid (TMB/H₂O₂). Gebrauchsfertig. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

8) STOPPLÖSUNG*

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

9) POSITIVES KONTROLLSERUM

Ein Fläschchen mit 0,2 ml Humanserum positiv für SS-A-Autoantikörper. Enthält 0,1% Natriumazid. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

10) NEGATIVES KONTROLLSERUM

Ein Fläschchen mit 0,2 ml Humanserum negativ für SS-A-Autoantikörper. Enthält 0,1% Natriumazid. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

*Diese Reagenzien können auch in den folgenden Testen verwendet werden: REAADS anti-RNP ELISA Test Kit, REAADS anti-Sm ELISA Test Kit, REAADS anti-SS-B ELISA Test Kit, REAADS anti-Scl-70 ELISA Test Kit, REAADS anti-Jo-1 ELISA Test Kit, and REAADS anti-CENP-B ELISA Test Kit.

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 Probendiluent 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 Abguss 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 Kits 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 SS-A-Autoantikörperspiegel 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.
- Die Kalibratoren, das Konjugat, 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 müssen am selben Tag verwendet werden.
* Die verdünnten Serum können auch in den folgenden Testen verwendet werden: REAADS anti-RNP ELISA Test Kit, REAADS anti-Sm ELISA Test Kit, REAADS anti-SS-B ELISA Test Kit, REAADS anti-Scl-70 ELISA Test Kit, REAADS anti-Jo-1 ELISA Test Kit, and REAADS anti-CENP-B ELISA Test Kit.
* 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 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)

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

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

*A₄₅₀ bedeutet: Extinktion bei 450 nm

*Da eine internationale Referenzpräparation für SS-A/Ro-Autoantikörper nicht verfügbar ist, ist der Test in relativen arbiträren Einheiten kalibriert.

■ QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testansatz müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

A₄₅₀ vom Kalibrator-1: ≤0,100

A₄₅₀ vom Kalibrator-2: ≥ 0,500

Die positiven und negativen Kontrollseren müssen folgende Ergebnisse zeigen:

| | Positivkontrolle | Negativkontrolle |
|-------------------|------------------|------------------|
| SS-A/Ro-Ak (U/ml) | > 100 | < 10 |

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.

| SS-A/Ro-Ak (U/ml) | Beurteilung |
|-------------------|------------------------|
| < 10 | Negativ für SS-A/Ro-Ak |
| ≥30 | Positiv für SS-A/Ro-Ak |

*Bei SS-A/Ro-Ak-Werten zwischen 10 und 30 U/ml sollten die klinischen Befunde und Ergebnisse anderer Untersuchungen besonders sorgfältig beachtet werden.

■ GRENZEN DES VERFAHRENS

Wie bei anderen diagnostischen Verfahren, so sind die mit REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit 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 | 18/34 | 52,9% |
| SLE | 31/70 | 44,3% |
| SjS | 85/132 | 64,4% |
| SSc | 12/68 | 17,6% |
| Normalkollektiv | 0/167 | 0% |

MCTD: Mischkollagenose

SLE: systemischer Lupus erythematodes

SjS: Sjögren-Syndrom

SSc: Systemsklerose

■ **PRÄZISION (IN DER SERIE)**

Bei 3 verschiedenen Proben, die mehr als 8mal in einem Ansatz getestet wurden, lag der VK jeder einzelnen Probe unter 15 %.

■ **MESSBEREICH**

Der Messbereich dieses Kits erstreckt sich von 5 U/ml bis 300 U/ml.

■ **INTERFERENZEN**

Hämoglobin (bis 480 mg/dl), Bilirubin (bis 20,0 mg/dl), Chylus (bis 2.780 Formazin-Einheiten) und / oder Rheumafaktoren (bis 520 IU/ml) beeinträchtigen die Testergebnisse nicht. Stark hämolytische und stark lipämische Proben sollten aber vermieden werden.

LITERATUR

1. Alspaugh, M. A., Tan, E. M.: Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. J. Clin. Invest. 55: 1067 - 1073, (1975).
2. Mattioli, M., Reichlin, M: Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. Arthritis Rheum. 25: 419-429, (1974).
3. St. Clair, E. W. et al.: Quantitative immunoassay of ant-La antibodies using purified recombinant La antigen. Arthritis and Rheum. 31: 506-514, (1988).
4. Paxton, H. et al.: Evaluation of the RheumaStrip ANA profile test: a rapid test strip procedure for simultaneously determining antibodies to autoantigens U1-Ribonucleoprotein (U1-RNP), Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, and to Native DNA. Clin. Chem. 36/5: 792-797, (1990).
5. Deutscher, S. L. et al.: Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9479-9483, (1988).

Español

INDICACIONES

La prueba para anticuerpos REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit es un procedimiento inmunoenzimático (ELISA) para la detección de autoanticuerpos específicos contra SS-A/Ro en suero humano. La prueba para anticuerpos REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit es para uso diagnóstico *in vitro* como ayuda en la determinación de ciertas enfermedades autoinmunes.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos anti-SS-A son autoanticuerpos contra antígenos nucleares solubles (ENA) que se presentan con alta frecuencia (88-96%) en el suero de pacientes con Síndrome de Sjögren (SS) y Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (24-60%). Ocasionalmente, se encuentran anticuerpos anti-SS-A en pacientes con Artritis Reumatoidea, Miositis y Escleroderma. Los anticuerpos anti-SS-B también son autoanticuerpos contra antígenos nucleares solubles (ENA) que se presentan con alta frecuencia (71-87%) en el Síndrome de Sjögren (SS) y, con menor frecuencia, en el LES (9-35%). Se ha confirmado que los anticuerpos anti-SS-A y anti-SS-B son idénticos al anti-Ro y anti-La respectivamente. Los anticuerpos anti-SS-B están asociados con frecuencia a los anticuerpos anti-SS-A, y es raro que se detecten aislados. Los anticuerpos anti-SS-B se encuentran exclusivamente en mujeres; y la presencia de ambos anticuerpos en madres e infantes está asociada a lesiones dérmicas, lupus neonatal y obstrucción cardíaca congénita.

La prueba para anticuerpos REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit utiliza la tecnología de alta sensibilidad de ELISA para medir autoanticuerpos específicos contra SS-A/Ro presentes en suero.

FUNDAMENTO

La prueba para anticuerpos REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit utiliza la tecnología de alta sensibilidad de ELISA para medir autoanticuerpos específicos contra SS-A/Ro presentes en suero. Se añaden calibradores y suero a pocillos revestidos con antígenos a fin de que los anticuerpos anti-SS-A 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 y calculan mediante la medición fotométrica de la reacción.

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

| | |
|---|--|
| | Añadir 100 µl de muestra diluida (1:101) a cada pocillo |
| <Incubación: Muestra> (20-25° C) 60 min. | 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 SS-A

TIRAS DE MICROPOCILLOS (12 x 8 pocillos) revestidos con antígenos producidos mezclando proteínas recombinantes purificadas. 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)

Dos viales con 1.5 ml de Diluyente de la Prueba, que contiene azida de sodio al 0.1%. Listo para usar, no necesita ser diluido. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

3) CALIBRADOR 2 (100 U/ml)

Dos viales con 1.5 ml de suero humano para control positivo de anticuerpos anti-SS-A con Diluyente de la Prueba, que contiene azida de sodio al 0.1%. Listo para usar, no necesita ser diluido. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

4) REACTIVO DEL CONJUGADO

Un vial con 15 ml de anticuerpos de cabra anti-IgG, IgA e IgM humanos conjugados con enzima peroxidasa (específicos para cadena pesada), HEPES, Proclin 150 y BSA. Listo para usar. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

5) DILUYENTE DE LA PRUEBA*

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

6) 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.

7) SOLUCIÓN DEL SUBSTRATO*

Un frasco de 20 ml con dihidrocloridato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina/peróxido de hidrógeno (TMB/H₂O₂). Listo para usar. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

8) 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.

9) SUERO PARA CONTROL POSITIVO

Un vial con 0.2 ml de suero humano para control positivo de anticuerpos anti-SS-A con azida de sodio al 0.1%. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

10) SUERO PARA CONTROL NEGATIVO

Un vial con 0.2 ml de suero humano para control negativo de anticuerpos anti-SS-A con azida de sodio al 0.1%. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

* Estos reactivos también se pueden usar para las pruebas siguientes: REAADS anti-RNP ELISA Test Kit, REAADS anti-Sm ELISA Test Kit, REAADS anti-SS-B ELISA Test Kit, REAADS anti-Scl-70 ELISA Test Kit, REAADS anti-Jo-1 ELISA Test Kit, and REAADS anti-CENP-B ELISA Test Kit.

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 ingiera 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 para anticuerpos anti-SS-A que se obtengan con esta prueba 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.
- 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 deben usar el mismo día de la prueba.
 - * Las muestras diluidas también se pueden usar para las pruebas siguientes: REAADS anti-RNP ELISA Test Kit, REAADS anti-Sm ELISA Test Kit, REAADS anti-SS-B ELISA Test Kit, REAADS anti-Scl-70 ELISA Test Kit, REAADS anti-Jo-1 ELISA Test Kit, and REAADS anti-CENP-B ELISA Test Kit.
 - * 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 sobre la placa. 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

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

* A_{450} es el valor de absorbancia a 450 nm.

*No se dispone de material internacional de referencia para anticuerpos anti-SS-A/Ro. La prueba está calibrada en unidades relativas arbitrarias.

■ CONTROL DE CALIDAD

Cada prueba debe cumplir con los siguientes criterios:

A_{450} del Calibrador1 : ≤ 0.100

A_{450} del Calibrador2 : ≥ 0.500

Los Controles Positivo y Negativo deben dar los siguientes resultados:

| | Control Positivo | Control Negativo |
|------------------------|------------------|------------------|
| Valor Anti-SS-A (U/mL) | > 100 | < 10 |

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

Antes de revisar 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 Anti-SS-A (U/ml) | Interpretación |
|------------------------|-------------------------------------|
| <10 | Negativo para anticuerpos anti-SS-A |
| Mayor o igual a 30 | Positivo para anticuerpos anti-SS-A |

Si se obtiene un valor de la unidad entre 10 y 30, se deben observar cuidadosamente la transición a la enfermedad y los resultados de otras pruebas.

■ LIMITACIONES

Al igual que otros procedimientos, los resultados que se obtengan con la prueba para anticuerpos REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit 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 | 18/34 | 52.9% |
| LES | 31/70 | 44.3% |
| SS | 85/132 | 64.4% |
| ESP | 12/68 | 17.6% |
| Suero normal | 0/167 | 0.0% |

EMTC: Enfermedad mixta del tejido conjuntivo

LES: Lupus eritematoso sistémico

SS: Síndrome de Sjögren

ESP: Esclerosis sistémica progresiva

■ 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 300 U/ml.

■ SUSTANCIAS INTERFERENTES

La hemoglobina (hasta 480 mg/dl), la bilirrubina (hasta 20.0 mg/dl), el quilo (hasta 2,780 unidades, de Formazine) y/o el factor reumatoideo (hasta 520 IU/ml) no afectan el resultado de la prueba. Sin embargo, evite usar muestras con niveles altos de hemólisis o lipemia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alspaugh, M. A., Tan, E. M.: Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 55: 1067 - 1073, (1975).
2. Mattioli, M., Reichlin, M: Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum.* 25: 419-429, (1974).
3. St. Clair, E. W. et al.: Quantitative immunoassay of ant-La antibodies using purified recombinant La antigen. *Arthritis and Rheum.* 31: 506-514, (1988).
4. Paxton, H. et al.: Evaluation of the RheumaStrip ANA profile test: a rapid test strip procedure for simultaneously determining antibodies to autoantigens U1-Ribonucleoprotein (U1-RNP), Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, and to Native DNA. *Clin. Chem.* 36/5: 792-797, (1990).
5. Deutscher, S. L. et al.: Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9479-9483, (1988).

Italiano

USO PREVISTO

REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit è un ELISA semi-quantitativo per il rilevamento di anticorpi anti-SS-A/Ro nel siero umano. REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit è previsto per uso diagnostico come aiuto nella determinazione di alcune malattie autoimmuni.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Anticorpi SSA sono anticorpi ENA presenti con alta frequenza (88-96%) nei sieri di pazienti con Sindrome di Sjögren (SS) e in SLE (24-60%). Anticorpi SSA sono inoltre trovati in pazienti con Artrite Reumatoide, Miosite e Scleroderma. Anticorpi SS-B sono anticorpi ENA presenti con elevata frequenza (71-87%) in sieri di pazienti con Sindrome di Sjögren (SS) e con bassa frequenza in SLE (9-35%). E' stato confermato che gli anticorpi anti-SSA e anti-SSB sono identici agli anticorpi anti-Ro e anti-La rispettivamente. Anticorpi SSB sono frequentemente associati ad anticorpi SSA e raramente rilevati da soli. Anticorpi SSB sono visti quasi esclusivamente in donne; la presenza di entrambi gli anticorpi SSA e SSB nella madre e nel bambino è associata con lesioni della pelle, lupus neonatale e blocco congenito del cuore.

REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit è il reagente per misurare, con metodo ELISA ad elevata sensibilità, gli anticorpi anti-SS-A/Ro presenti nel siero.

PRINCIPIO

REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit misura anticorpi anti-SS-A/Ro presenti nel siero attraverso ELISA. Calibratori e siero dei pazienti sono aggiunti ai pozzetti sensibilizzati con antigeni SS-A, permettendo agli anticorpi anti-SS-A/Ro di reagire con l'antigene immobilizzato (Incubazione del campione). Dopo lavaggio per rimuovere le proteine del siero non legate, un coniugato di anticorpi anti IgG, IgA ed IgM umane con horseradish perossidasi viene aggiunto ed incubato (Incubazione del coniugato). Dopo altri lavaggi, il substrato per la perossidasi viene aggiunto per un tempo addizionale (Incubazione del substrato). La Soluzione acida viene quindi aggiunta ad ogni pozzetto per bloccare la reazione enzimatica e stabilizzare lo sviluppo del colore. Il dosaggio può essere quantificato misurando la reazione al fotometro e riportando su calcolare i risultati.

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) SS-A STRIPS DI POZZETTI MICROTITER

96 Pozzetti di piastre microtiter in Strips (8 x 12 pozzetti) coatati con proteine ricombinanti purificate. 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 test, contenente sodiazide 0.1%. Pronto all'uso. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

3) CALIBRATORE 2 (100 U/ml)

Due flaconi contenenti 1.5ml di siero umano positivo per anticorpi anti-SS-A con Diluente del test, contenente sodiazide 0.1%. Pronto all'uso. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

4) CONIUGATO

Un flacone contenente 15 ml di anticorpo in capra anti IgG, IgA ed IgM umane (specifico catene pesanti) coniugato con horseradish perossidasi, Hepes, Proclin 150 e BSA. Pronto all'uso. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

5) DILUENTE DEL TEST*

Due flaconi contenenti 50ml di PBS, Tween 20, albumina da siero bovino e 0.1% sodioazide. Pronto all'uso. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata

6) 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.

7) SUBSTRATO*

Un flacone contenente 20ml of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride /hydrogen peroxide (TMB/ H₂O₂). Pronto all'uso. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

8) SOLUZIONE BLOCCANTE*

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

9) SIERO DI CONTROLLO POSITIVO

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

10) SIERO DI CONTROLLO NEGATIVO

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

*Questi reagenti possono essere usati anche per REAADS anti-RNP ELISA Test Kit, REAADS anti-Sm ELISA Test Kit, REAADS anti-SS-B ELISA Test Kit, REAADS anti-Scl-70 ELISA Test Kit, REAADS anti-Jo-1 ELISA Test Kit, and REAADS anti-CENP-B ELISA Test Kit.

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 Controllo Negativo 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 SS-A 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.
- Non diluire Calibratore 1, Calibratore 2, Coniugato, 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 un giorno.
*I campioni diluiti possono essere anche impiegati per REAADS anti-RNP ELISA Test Kit, REAADS anti-Sm ELISA Test Kit, REAADS anti-SS-B ELISA Test Kit, REAADS anti-Scl-70 ELISA Test Kit, REAADS anti-Jo-1 ELISA Test Kit, and REAADS anti-CENP-B ELISA Test Kit.
*Il Diluente del test può formare precipitati che non causano inconvenienti nei risultati.

■ PROCEDURA DEL TEST

FASE 1. (INCUBAZIONE DEL CAMPIONE)

Pipettare con una pipetta multicanale 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 il 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 micropiastre, 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

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

*A₄₅₀ è l'abbreviazione del valore di assorbanza a 450 nm.

*Non è disponibile un appropriato materiale di riferimento internazionale per misurare gli anticorpi anti-SS-A/Ro. Il dosaggio è calibrato in unità arbitrarie relative.

■ CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni dosaggio dovrebbe rispondere ai seguenti criteri.

A₄₅₀ del Calibratore1: ≤0.100

A₄₅₀ del Calibratore2: ≥0.500

I Controlli Positivo e Negativo devono dare i seguenti risultati:

| | Controllo Positivo | Controllo Negativo |
|----------------------|--------------------|--------------------|
| Anti-SS-B val.(U/ml) | > 100 | < 10 |

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-SS-A Valore (U/ml) | Interpretazione |
|-----------------------------|----------------------------------|
| < 10 | Negativo per Anticorpi Anti-SS-A |
| Più grande di o uguale a 30 | Positivo per Anticorpi Anti-SS-A |

Se il valore in unità calcolato è tra 10 e 30, l'evolversi della situazione clinica ed i risultati di tutti gli altri test devono essere attentamente osservati.

■ LIMITAZIONI

Come con le altre procedure diagnostiche, i risultati ottenuti con REAADS anti-SS-A ELISA Test Kit servono solo come aiuto nella diagnosi e non dovrebbero essere considerati di per sé diagnostici.

PRESTAZIONI CARATTERISTICHE

■ SPECIFICITA' CLINICA E SPECIFICITA'

| Malattia | Campione | Percent. di |
|---------------|----------|-------------|
| MCTD | 18/34 | 52.9% |
| SLE | 31/70 | 44.3% |
| SjS | 85/132 | 64.4% |
| SSc | 12/68 | 17.6% |
| Siero Normale | 0/167 | 0.0% |

MCTD: malattia mista del tessuto connettivo

SLE: lupus sistemico eritematoso

SjS: sindrome di Sjogren

SSc: sclerosi sistemica

■ RIPRODUCIBILITA' (INTRA-ASSAY)

Quando 3 differenti campioni sono stati testati ripetutamente più di 8 volte, CV di ogni campione è stato inferiore al 15 %.

■ RANGE DEL DOSAGGIO

Il range del dosaggio di questo kit è da 5 U/ml a 300 U/ml.

■ SOSTANZE INTERFERENTI

Emoglobina (fino a 480 mg/dl), Bilirubina (fino a 20 mg/dl) e/o chilo (fino a 2,780 unità come Formazine) e/o Fattore Reumatoide (fino a 520 IU/ml) non influenzano i risultati del test, ma si eviti di usare campioni altamente emolizzati o lipemici .

BIBLIOGRAFIA

1. Alspaugh, M.A., Tan, E.M.: Antibodies to cellular antigen in Sjögren syndrome. J.Clin.Invest. 55:1067-1073, (1975).
2. Mattioli, M., Reichlin, M.: Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic non ribosomal antigen. Arthritis Rheum. 25:419-429, (1974).
3. St.Clair, E.W., et al.: Quantitative immunoassay of anti-La antibodies using purified recombinant La antigen. Arthritis Rheum. 31 :506-514, (1988).
4. Paxton, H., et al. : Evaluation of the RheumaStrip ANA profile test : a rapid test strip procedure for simultaneously determining antibodies to autoantigens U1-Ribonucleoprotein (U1-RNP), Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, and to Native DNA. Clin.Chem. 36/5:792-797, (1990).
5. Deutscher, S.L. et al.: Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85:9479-9483, (1988).

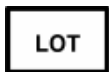
**The following symbols are used on the label.
 **Les symboles suivants ont été utilisés sur l'étiquette
 **Die folgenden Symbole finden Sie auf dem Etikett
 **En las etiquetas se usan los siguientes símbolos
 **I seguenti simboli sono usati sulle etichette.



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
 Uso 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

Manufactured for:

CORGENIX, INC.

11575 Main Street, Suite 400

Broomfield, Colorado 80020 USA

REAADS® is a registered trademark of Corgenix REAADS, Inc.

© 2006, Corgenix REAADS, Inc.

EC REP

MT Promedt Consulting GmbH

Altenhofstrasse 80

D-66386 St. Ingbert / Germany

11689 01

Effective: 2006-08-15

