



## Instructions for Use

# ANA Screen-6 ELISA

IVD



REF EIA-4326

$\Sigma$  96



**DRG**

DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:

**DRG**

DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Utilizzare esclusivamente la versione valida delle Istruzioni per l'uso in dotazione con il kit.  
Por favor, utilizar solo la versión válida de las instrucciones de uso que se incluyen en el kit.  
Veuillez n'utiliser que le version valide du mode d'emploi fournie avec les kits.  
Utilize apenas a versão das Instruções de Utilização em vigor fornecida com o kit.**

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos / Sommaire / Índice**

1	INTRODUCTION AND BACKGROUND <b>EN</b> .....	3
2	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	3
3	PRINCIPLE OF THE TEST .....	4
4	CONTENTS OF THE KIT .....	4
5	MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED .....	4
6	STORAGE OF THE KIT .....	4
7	REAGENT AND SAMPLE PREPARATION / SPECIMEN REQUIREMENTS .....	5
8	ASSAY PROCEDURE .....	5
9	EVALUATION AND QUALITY CONTROL .....	6
10	INTERPRETATION OF RESULTS / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE .....	6
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	7
12	WARRANTY .....	10
13	SUMMARY FLOW CHART .....	11
1	EINFÜHRUNG UND HINTERGRUND <b>DE</b> .....	12
2	SICHERHEITSHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN .....	12
3	TESTPRINZIP .....	13
4	INHALT DES TESTKITS .....	13
5	BENÖTIGTES, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIAL .....	13
6	AUFBEWAHRUNG DES TESTKITS .....	13
7	REAGENZ- UND PROBENVORBEREITUNG / ANFORDERUNGEN AN DIE PROBEN .....	14
8	DURCHFÜHRUNG DES TESTS .....	14
9	AUSWERTUNG UND QUALITÄTSKONTROLLE .....	15
10	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE / GRENZEN DER METHODE .....	15
11	TESTCHARAKTERISTA .....	16
12	GARANTIE UND HAFTUNG .....	19
13	KURZANLEITUNG .....	20
1	INTRODUZIONE E DESCRIZIONE GENERALE <b>IT</b> .....	21
2	AVVERTENZE E PRECAUZIONI .....	21
3	PRINCIPIO DELLA METODICA .....	22
4	CONTENUTO DEL KIT .....	22
5	MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI .....	22
6	CONSERVAZIONE DEL KIT .....	22
7	PREPARAZIONE DI REAGENTE E CAMPIONE / REQUISITI PER I CAMPIONI DA TESTARE .....	23
8	PROCEDURA DI TEST .....	23
9	VALUTAZIONE E CONTROLLO DELLA QUALITÀ .....	24
10	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI / LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA .....	24
11	CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI .....	25
12	GARANZIA .....	28
13	DIAGRAMMA DI FLUSSO RIASSUNTIVO .....	29

1	INTRODUCCIÓN E INFORMACIÓN PREVIA <b>ES</b> .....	30
2	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES .....	30
3	PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....	31
4	CONTENIDO DEL KIT .....	31
5	MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS .....	31
6	ALMACENAMIENTO DEL KIT .....	31
7	PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MUESTRAS / REQUISITOS DE LA MUESTRA .....	32
8	PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO .....	32
9	EVALUACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD .....	33
10	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS / LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO .....	33
11	CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO .....	34
12	GARANTÍA .....	37
13	CUADRO RESUMEN .....	38
1	INTRODUCTION ET CONTEXTE <b>FR</b> .....	39
2	AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS .....	39
3	PRINCIPE DU TEST .....	40
4	CONTENU DU KIT .....	40
5	MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI .....	40
6	CONSERVATION DU KIT .....	40
7	PREPARATION DES REACTIFS ET DE L'ECHANTILLON / ECHANTILLONS REQUIS .....	41
8	PROCEDURE DU TEST .....	41
9	ÉVALUATION ET CONTROLE QUALITE .....	42
10	INTERPRETATION DES RESULTATS / LIMITES DE LA PROCEDURE .....	42
11	CARACTERISTIQUES DE LA PERFORMANCE .....	43
12	GARANTIE .....	46
13	RECAPITULATIF .....	47
1	INTRODUÇÃO E CONTEXTO <b>PT</b> .....	48
2	ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES .....	48
3	PRINCÍPIO DO TESTE .....	49
4	COMPONENTES DO KIT .....	49
5	MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS .....	49
6	CONSERVAÇÃO DO KIT .....	49
7	REQUISITOS / PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E DO REAGENTE .....	50
8	PROCEDIMENTO DO ENSAIO .....	50
9	AVALIAÇÃO E CONTROLO DE QUALIDADE .....	51
10	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS / LIMITES DO PROCEDIMENTO .....	51
11	CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO .....	52
12	GARANTIA .....	55
13	FLUXOGRAMA DE SÍNTESE .....	56
14	REFRENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFIA / PUBLICATIONS / LITERATURA .....	57
	SYMBOLS USED .....	58

## 1 INTRODUCTION AND BACKGROUND

Circulating autoantibodies against various intracellular antigens (antinuclear antibodies, ANA) are characteristic for systemic, autoimmune-mediated rheumatic diseases of the connective tissue (1, 2, 3, 4). These comprise Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Mixed Connective Tissue Disease (MCTD), Sjögren's Syndrome (SS) A and B, Progressive Systemic Sclerosis (PSS, Scleroderma), and Polymyositis (PM).

The diagnosis of the above disorders is often difficult, due to overlapping symptoms, and therefore usually supported by measuring their associated antibodies. 6 autoantigens specifically recognised by these antibodies are immobilised on the solid phase of the present enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA):

<b>antigen</b>	<b>source</b>	<b>disease</b>	<b>autoantibody prevalence (5)</b>
RNP (proteins A, C, 68kDa)	recombinant	MCTD	95 %
		SLE	30 - 40 %
		PM	14 %
		SS	4 %
Sm (proteins B, B', D)	bovine thymus	SLE	12 - 39 %
		MCTD	7 %
SS-A/Ro (60kDa-protein)	bovine thymus	SS	60 - 100 %
		SLE	45 - 50 %
		MCTD	15 - 30 %
		PSS	5 - 7 %
		PM	5 - 7 %
SS-B/La	recombinant	SS	30 - 90 %
		SLE	15 - 30 %
		MCTD	5 - 15 %
Sci-70 (DNA-topoisomerase 1)	recombinant	PSS	20 - 76 %
Jo-1 (Histidyl-tRNA-synthetase)	recombinant	PM	20 - 40 %

The test is designed for the qualitative, summary determination of the respective autoantibodies (IgG) in human serum or plasma (cf. section 7), without the ability to discriminate between them. It is intended as initial screen test for an overall diagnosis of the above disorders. The test is fast (incubation time 30 / 30 / 30 minutes) and flexible (divisible solid phase, ready-to-use reagents). A negative and a positive control check the assay performance. The positive control also serves as calibrator for assay evaluation.

## 2 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- The test kit is intended for in vitro diagnostic use only; not for internal or external use in humans or animals. It must be executed by trained personnel staff.
- Do not use reagents beyond their expiration dates. Adherence to the protocol is strongly recommended.
- The sample buffer and controls contain Na-azide as antimicrobial agent. The wash buffer contains bromonitrodioxane and the conjugate methylisothiazolone / bromonitrodioxane as preservative. The substrate contains 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The stop solution, 0.2 M sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), is acidic and corrosive.
- The above mentioned reagents may be toxic if ingested. Follow routine precautions for handling hazardous chemicals. Avoid all body contact, wear gloves and eye protection. If one of the reagents comes into contact with skin or mucous membrane, wash thoroughly with water. Never pipette by mouth. Dispose in a manner complying with local/national regulations.
- Na-Azide may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal, flush with a large amount of water to prevent azide build-up.
- The controls contain components of human origin. They were tested for human immunodeficiency virus (HIV)-Ag, hepatitis B surface (HBs)-Ag and antibodies against HIV 1/2 and hepatitis C virus (HCV) and showed negative results; either in an FDA-approved or a CE-compliant test, according to European Directive 98/79/EC.
- However, no test can guarantee that material of human origin is not actually infectious. The preparations should therefore be treated as potentially infectious and disposed of accordingly, as should the samples (and residues thereof); according to CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA) or other local / national guidelines on laboratory safety and decontamination.

### 3 PRINCIPLE OF THE TEST

The wells of the solid phase are coated with a balanced mixture of the autoantigens quoted above. On this surface, the following immunological reactions take place:

- 1<sup>st</sup> reaction: Antigen-specific antibodies present in the sample bind to the immobilised antigen, forming the antigen-antibody complex. Then, non-bound sample components are washed away from the solid phase.
- 2<sup>nd</sup> reaction: A second antibody, directed at human IgG antibodies and conjugated with horse-radish peroxidase (HRP), is added. This conjugate binds to the complex. Then, excess conjugate is washed away from the solid phase.
- 3<sup>rd</sup> reaction: The enzyme-labelled complex converts a colourless substrate into a blue product. The degree of colour development reflects the concentration of antigen-specific IgG autoantibodies in the sample.

### 4 CONTENTS OF THE KIT

- a. **1 Microwell plate**, coated with a mixture of the above antigens, hermetically packed in a foil laminate pouch together with a desiccant bag. The plate consists of 12 strips, each of which can be broken into 8 individual wells.

MWP	12x8
-----	------

- b. **Sample buffer**, 100 mL, ready-to-use, orange coloured. Contains Tris-buffered saline (TBS), bovine serum albumin (BSA), Tween and Na-azide.

BUF	SPL
-----	-----

- c. **Wash buffer**, 100 mL, 10x-concentrate, blue coloured. Contains TBS, Tween and bromonitrodioxane.

BUF	WASH	10x
-----	------	-----

- d. **Negative and positive control**, 3.0 mL each, ready-to-use, green and red coloured, respectively. Contain TBS, BSA, Tween and Na-azide.

CONTROL	-	CONTROL	+
---------	---	---------	---

- e. **Anti-human IgG HRP conjugate**, 14 mL, ready-to-use, red coloured. Buffered solution containing stabilising protein, methylisothiazolone and bromonitrodioxane.

CONJ	IgG
------	-----

- f. **Substrate solution**, 14 mL, ready-to-use, colourless. Contains a buffered solution of TMB and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Contained in a vial impermeable to light.

SUBS	TMB
------	-----

- g. **Stop solution** (0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 14 mL, colourless, ready-to-use. Caution: sulfuric acid is corrosive.

SOLN	STOP
------	------

- h. Directions for use

- i. Lot-specific certificate of analysis

### 5 MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Deionised or distilled water
- Graduated cylinder, 1000 mL
- Tubes for sample dilution (transfer tubes in the microwell plate format recommended)
- Pipettes for 10, 100 and 1000 µL (1- and 8-channel pipettes recommended)
- Microwell plate washer (optional)
- Microwell plate photometer fitted with a 450 nm filter
- ELISA evaluation program (recommended)

### 6 STORAGE OF THE KIT

Store kit at 2 °C - 8 °C. It is stable up to the expiry date stated on the label of the box. Do not use kit beyond its expiry date.

## 7 REAGENT AND SAMPLE PREPARATION / SPECIMEN REQUIREMENTS

Do not exchange or pool corresponding components from different kits, due to possibly different shipping or storage conditions. If the kit is to be used for several tests, only the currently needed amount of reagents should be withdrawn. It is crucially important that no cross-contamination between the reagents occurs. Use only clean pipettes and do not pour back residues into the original flasks.

- a. The solid phase must reach room temperature before opening the pouch. Remove the supernumerary microwells from the frame and immediately put them back into the pouch, together with the desiccant bag. Reseal the pouch hermetically and keep it refrigerated for future use.
- b. Dilute the wash buffer 10x-concentrate (100 mL, blue) with 900 mL deionised water. Mix thoroughly. The diluted buffer is stable for several weeks if stored refrigerated (2 °C - 8 °C).

- c. Preparation of the samples:

Handle patient specimens as potentially infectious agents.

**Besides serum, EDTA-, citrate- or heparin-treated plasma is suitable sample material as well.**

Specimen requirements: Highly lipemic, haemolysed or microbially contaminated sera may cause erroneous results and should be avoided.

Prepare samples using normal laboratory techniques and dilute them **1/100**, e.g. 10 µL serum or plasma + 990 µL sample buffer. Mix thoroughly.

For rapid dispensing during the assay procedure, preparation of the controls and samples in microwell transfer tubes is recommended. This allows the operation of an 8-channel pipette during the assay procedure.

If samples are not assayed immediately, they should be stored at 2 °C - 8 °C and assayed within 3 days. For longer storage, -20 °C or lower temperatures are recommended. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided. Thawed samples must be mixed prior to diluting.

## 8 ASSAY PROCEDURE

### 8.1 Manual operation

Before starting the assay, all components of the kit must have reached room temperature (23 °C ± 3 °C).

To achieve best results, i.e. the maximum ratio between specific and background signal, **careful washing** is essential (steps a, c and e). It is **crucially important to remove the wash solution completely**. For that purpose, tap the plate firmly on several layers of absorbent tissue. Automated washers must be verified according to results obtained by manual washing.

- a. Immediately prior to use, wash the solid phase once:  
fill wells with **350 µL wash buffer** each, let soak for about 10 seconds in the wells and remove.
- b. Dispense the **controls** and the **diluted samples** rapidly into the microwells; **100 µL** per well.  
Duplicate measurements are recommended.

*Incubate the plate for 30 minutes at room temperature (23 °C ± 3 °C).*

- c. Wash the wells 4 times as in step a.
- d. Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the **conjugate**; **100 µL** per well.

*Incubate the plate as in step b.*

- e. Repeat wash step c.
- f. Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the **substrate solution**; **100 µL** per well.

*Incubate the plate as in step b.*

As the substrate is photosensitive, avoid intense light exposure (e.g. direct sunlight) during incubation.

- g. Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the **stop solution**; **100 µL** per well.  
Use the same sequence as for the substrate. The colour changes from blue to yellow. Agitate the plate, preferably on an orbital shaker, for about 10 seconds.
- h. Immediately read the absorbance in the microwell plate photometer at 450 nm.

Refrigerate the remainder of the reagents (2 °C - 8 °C) if they are to be used again.

## 9 EVALUATION AND QUALITY CONTROL

The assay is evaluated in a qualitative manner: the absorbance of the samples is compared to the borderline absorbance (= cut-off absorbance). The cut-off absorbance is determined by means of the positive control which at the same time functions as calibrator, according to the formula:

$$\text{absorbance borderline} = \text{absorbance positive control} \times \text{factor}$$

The factor depends on the kit lot and is quoted in the lot-specific certificate of analysis (included with each test kit).

Example:

$$\begin{aligned} \text{absorbance positive control} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{factor} &= 0.35 \\ \text{absorbance borderline} &= 1250 \text{ mOD} \times 0.35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

In order to gain an impression of the degree of a sample's reactivity, the ratio between sample and borderline absorbance is calculated:

$$\text{Ratio} = \text{absorbance sample} / \text{absorbance borderline}$$

Example:

$$\begin{aligned} \text{absorbance borderline} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{absorbance sample} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3.4 \end{aligned}$$

### Quality control:

The positive control (calibrator) and negative control check the assay performance. Their acceptable ranges are quoted in the lot-specific certificate of analysis. Values of the controls must fall within the indicated ranges; otherwise, the results of the assay are invalidated.

## 10 INTERPRETATION OF RESULTS / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Based on the measurement of a blood donor and a positive collective of sera (see below), we suggest for the assessment of patient sera:

	<b>Ratio</b>
normal (negative) range	< 0.82
cut-off	1.00
equivocal range	0.82 - 1.20
positive range	> 1.20

These specifications are given as an indication only; in order to check their accuracy, each analysis should include parallel samples of normal sera.

A **negative test result** indicates that the patient probably does not have an elevated level of IgG antibodies to the antigens listed in the beginning. Therefore, presence of a systemic rheumatic disease is rather unlikely but can nevertheless not be excluded.

A **positive result** should be considered as an indication for one of the above listed diseases. As follow-up diagnosis, the specificity of the causative autoantibody and hence the identity of the autoimmune disorder should be determined. This can be achieved by means of a differentiating profile ELISA.

Specimens exhibiting results within the borderline range quoted above should be considered as **equivocal** and reported as such. It is recommended that a second sample be collected two weeks later and run in parallel with the first sample to document a possible change of antibody titer.

As with any serological test, the results should be interpreted in the light of the patient's symptoms and other diagnostic criteria.

## 11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1 Standardisation

The test is standardised with a purified serum preparation containing IgG antibodies directed at each of the immobilised autoantigens. It constitutes the stock material for both controls of the test. The proportion of the antibodies is adjusted in such a manner that each one contributes approximately the same fraction to the overall signal.

The stock preparation is calibrated against a set of monospecifically positive sera solely reserved for this purpose. The degree of sample reactivity is expressed as summary ratio, as outlined above.

### 11.2 Analytical Specificity

The test permits the specific determination of human IgG antibodies, directed at the autoantigens quoted in article 1. It has been validated (among other criteria) using human reference sera from the Center of Disease Control (CDC; Atlanta, USA) which are commercially available. The following results (ratio values) are typical:

Serum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC-result	ds-DNA	SS-B/La	--	U1-RNP	Sm	--	SS-A/Ro	--	Scl-70	Jo-1
Immunfluoresc.	homogen	speckled	speckled	--	--	nucleolar	--	centromere	--	--
ratio	2.1	8.7	7.6	3.3	8.4	1.0	6.2	0.3	6.6	8.2

*Remarks:* The corresponding ANA Profile 8 ELISA which differentiates between the antigens revealed: Serum # 1 reacts not only with dsDNA but also with Sm. Serum # 6 shows ratio values  $\leq 1$  towards all single antigens. Serum # 8 reacts strongly with centromere-protein B which is not included in the antigen range of the present ANA Screen 6 ELISA.

### 11.3 Detection limit (analytical sensitivity)

The detection limit is defined as that concentration of analyte that corresponds to the mean absorbance of sample buffer plus 3-fold standard deviation (s). It was determined as  $< 0.4$  (ratio;  $n = 24$ ).

Recommended measuring range:  $0.5 < \text{ratio} < 6$

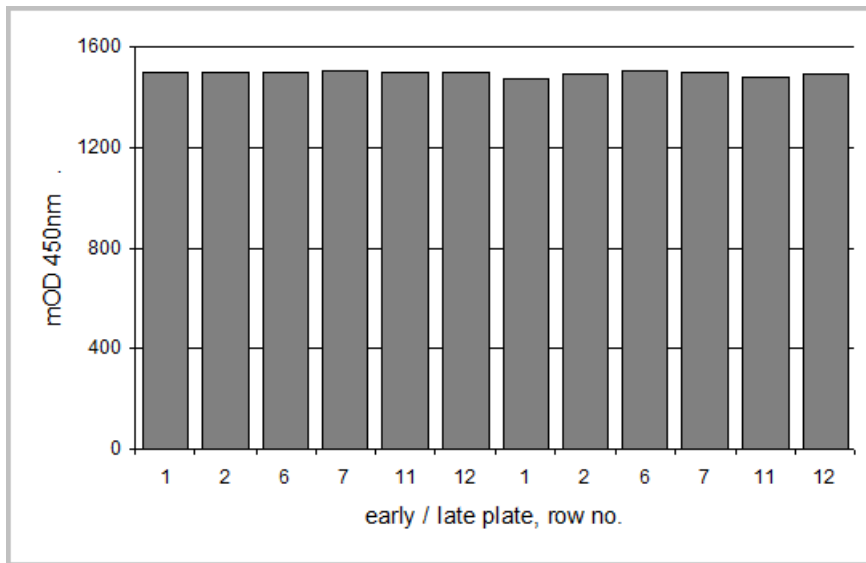
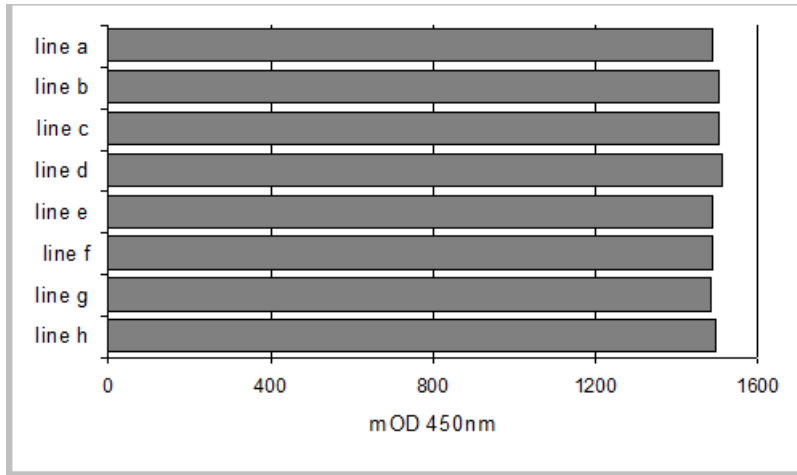
### 11.4 Homogeneity of the solid phase

Measurement of the solid phase homogeneity is a regular QC part of each production lot. This is determined by 288-fold measurement of a positive but non-saturating sample on 3 selected plates.

Acceptance criterion: mOD-coefficient of variation (CV) over the plates  $< 8\%$ . The figure below shows a representative excerpt (solid phase lot no. 23081) of such an analysis.

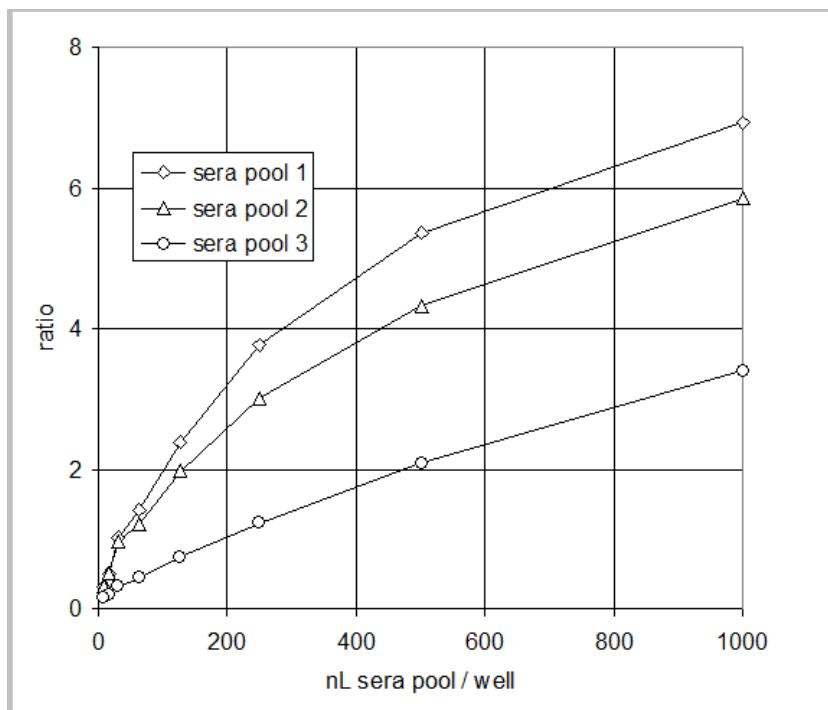
plate	early (n/10)						late (9n/10)						mean	CV%
	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11	12		
line a	1464	1480	1490	1527	1476	1475	1490	1492	1495	1461	1478	1525	1488	1.4
line b	1514	1522	1528	1511	1487	1489	1472	1480	1504	1534	1484	1519	1504	1.4
line c	1488	1520	1518	1531	1524	1509	1464	1503	1529	1506	1463	1484	1503	1.6
line d	1517	1500	1518	1524	1533	1529	1497	1508	1528	1522	1461	1491	1511	1.4
line e	1504	1492	1499	1472	1473	1503	1471	1483	1498	1501	1497	1457	1488	1.1
line f	1480	1482	1468	1505	1478	1498	1438	1502	1503	1488	1510	1515	1489	1.4
line g	1493	1465	1478	1493	1512	1507	1457	1460	1481	1483	1475	1500	1484	1.2
line h	1545	1516	1504	1519	1517	1496	1466	1487	1504	1497	1468	1457	1498	1.7
mean	1501	1497	1500	1510	1500	1501	1469	1489	1505	1499	1480	1494	<b>1495</b>	
CV%	1.7	1.4	1.4	1.3	1.6	1.1	1.3	1.0	1.1	1.5	1.1	1.8		<b>1.5</b>





**11.5 Dose-response relationship**

In order to assess this feature of the ELISA, several pools of individual sera with heterogeneous reactivity were measured in serial 2-fold dilution. A typical result is depicted below. An approximately linear relationship between sample concentration and resulting ratio is restricted to ratio values < 2. This is due to the qualitative evaluation manner (cf. article 9) and contrasts ELISAs which are evaluated quantitatively by means of a standard curve.



## 11.6 Precision

For the assessment of the test precision, the variability of results under the following conditions was determined:

- within 1 assay and between 3 assays,
- between 3 operators and
- between 2 kit lots.

### a. Intra- and inter-assay variability (n = 24 and 72, respectively)

sample	ratio	variability (CV, %)	
		intra-assay	inter-assay
1	1,2	3,0	3,3
2	3,2	2,0	3,0
3	4,9	1,8	4,1

### b. Operator to operator variability (n = 12)

sample	ratio	variability (CV, %)
1	1,2	1,7
2	3,2	1,7
3	4,7	1,8

### c. Variability between 2 kit lots (n = 6)

sample	ratio	variability (CV, %)
1	1,0	11,9
2	2,9	11,9
3	4,4	9,2

## 11.7 Frequency distribution of ANAs (IgG)

This was analysed in a sera collective of blood donors, equally distributed by sex and age, and a collective of sera which had been found positive by independent methods (e.g. monospecific, CE-compliant reference ELISAs, immune fluorescence assays (IFA)) for at least one parameter or were clinically defined.

The following summary distribution of the analytes was observed (s = standard deviation):

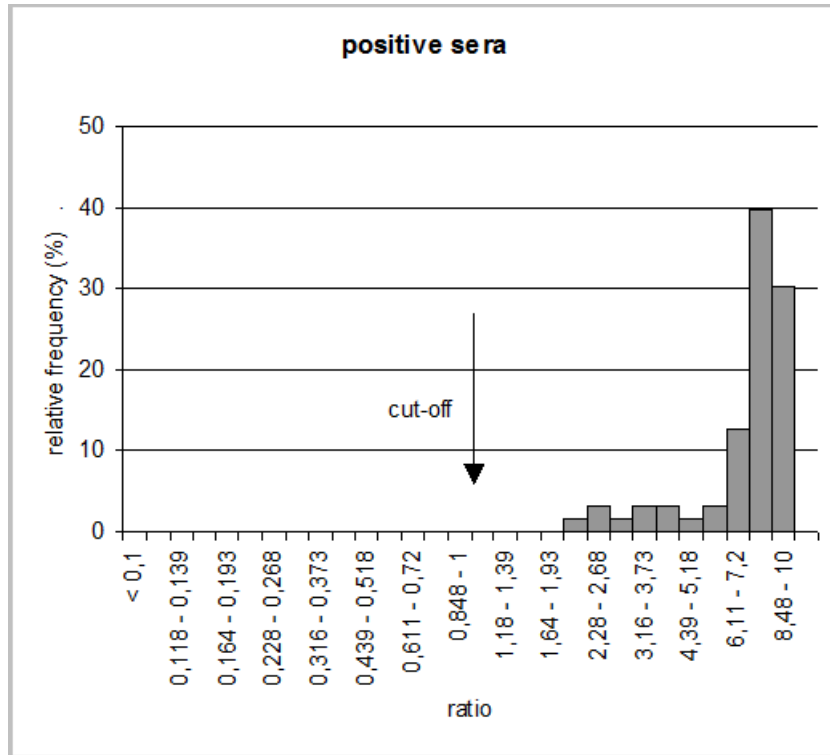
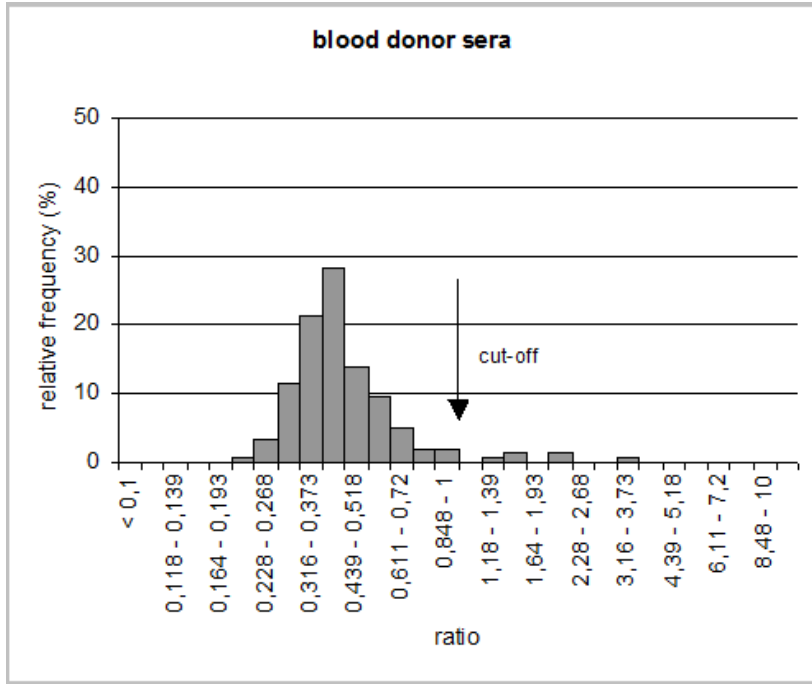
### blood donor sera

n: 160  
 mean: ratio = 0.49  
 mean + s: ratio = 0.84  
 mean + 2s: ratio = 1.19  
 median: ratio = 0.40  
 95<sup>th</sup> percentile: ratio = 0.94

### positive sera

n: 63  
 mean: ratio = 7.3  
 mean - s: ratio = 5.4  
 mean - 2s: ratio = 3.5  
 median: ratio = 7.8  
 5<sup>th</sup> percentile: ratio = 2.9

ROC-analysis of these data was used to determine the cut-off of the ANA Screen 6 ELISA according to (6). The data presented here suggest a diagnostic specificity and sensitivity of the ELISA of about 96 and nearly 100 %, respectively. These values apply for the measured sera only; other collectives may yield different results.



**12 WARRANTY**

DRG guarantees that the product delivered has been thoroughly tested to ensure that its properties specified herein are fulfilled. No further warranties are given.

The performance data presented here were obtained using the procedure indicated. Any modification in the procedure may affect the results in which case DRG disclaims all warranties whether expressed, implied or statutory. Moreover, DRG accepts no liability for any damage, whether direct, indirect or consequential, which results from inappropriate use or storage of the product.

**13 SUMMARY FLOW CHART**

- a. Dilute the samples 1/100 in sample buffer (100 mL, ready-to-use, orange) and mix.
- b. Dilute the wash buffer 10x-concentrate (100 mL, blue) with water and mix.
- c. Wash the wells once with 350  $\mu$ L wash buffer each.  
Dispense 100  $\mu$ L of the controls (3.0 mL each, ready-to-use, green and red) and of the diluted samples into the wells of the solid phase. Duplicate measurements are recommended.  
Incubate for 30 minutes at room temperature ( $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
- d. Wash the wells 4 times with 350  $\mu$ L wash buffer each.
- e. Dispense 100  $\mu$ L of the conjugate (14 mL, ready-to-use, red) into the wells.  
Incubate as in step c.
- f. Repeat washing step d.
- g. Dispense 100  $\mu$ L of the substrate solution (14 mL, ready-to-use, black vial) per well.  
Incubate as in step c.  
Then, add 100  $\mu$ L stop solution (14 mL, ready-to-use, colourless) per well and agitate the plate briefly.
- h. Immediately measure the absorbance at 450 nm.
- i. Evaluation:  
Determine the borderline absorbance by multiplying the absorbance of the positive control with the factor quoted in the certificate of analysis. Then, calculate the ratio of the samples by dividing their absorbance by the borderline absorbance.

## 1 EINFÜHRUNG UND HINTERGRUND

Zirkulierende Autoantikörper gegen vielfältige zelluläre Antigene (antinukleäre Antikörper, ANA) sind charakteristisch für systemische, autoimmun-bedingte, rheumatische Erkrankungen des Bindegewebes (1, 2, 3, 4). Zu diesen zählen: Systemischer Lupus Erythematodes (SLE), Mischkollagenose (Mixed Connective Tissue Disease, MCTD), Sjögren-Syndrom (SS) A und B, progressive systemische Sklerodermie (PSS) bzw. CREST-Syndrom und Polymyositis (PM).

Die Diagnose dieser Krankheiten ist oft wegen überlappender Symptome schwierig; sie wird daher meist durch Messung der jeweils assoziierten Autoantikörper unterstützt. 6 der von diesen Antikörpern spezifisch erkannten Antigene sind auf der Festphase des vorliegenden Enzyme-linked Immuno Sorbent Assays (ELISA) immobilisiert:

<b>Antigen</b>	<b>Quelle</b>	<b>Krankheit</b>	<b>ungefähre Antikörperprävalenz (5)</b>
RNP (Proteine A, C, 68kDa)	rekombinant	MCTD	95 %
		SLE	30 - 40 %
		PM	14 %
		SS	4 %
Sm (Proteine B, B', D)	Kalbsthymus	SLE	12 - 39 %
		MCTD	7 %
SS-A/Ro (60kDa-Protein)	Kalbsthymus	SS	60 - 100 %
		SLE	45 - 50 %
		MCTD	15 - 30 %
		PSS	5 - 7 %
		PM	5 - 7 %
SS-B/La	rekombinant	SS	30 - 90 %
		SLE	15 - 30 %
		MCTD	5 - 15 %
Scl-70 (DNA-Topoisomerase 1)	rekombinant	PSS	20 - 76 %
Jo-1 (Histidyl-tRNA-Synthetase)	rekombinant	PM	20 - 40 %

Der Test dient dazu qualitativ und summarisch die betreffenden IgG-Autoantikörper in menschlichem Serum oder Plasma (vgl. Abschnitt 7) zu bestimmen. Er kann jedoch nicht zwischen ihnen diskriminieren und dient daher der pauschalen Eingangsdiaagnose der o.g. Erkrankungen. Der Test ist schnell (Inkubationszeit 30 / 30 / 30 Minuten) und flexibel (teilbare Festphase, gebrauchsfertige Reagenzien). Eine negative und eine positive Kontrolle prüfen die Funktion des Testansatzes; die Positivkontrolle dient gleichzeitig als Kalibrator für die Testauswertung.

## 2 SICHERHEITSHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Der Test ist ausschließlich für die in vitro-Diagnostik bestimmt; nicht für die interne oder externe Anwendung an Menschen oder Tieren. Er darf nur von geschultem Personal eingesetzt werden.
- Die Reagenzien nicht über ihr Verfallsdatum hinaus verwenden. Es wird nachdrücklich empfohlen, das Protokoll genau einzuhalten.
- Als antimikrobielles Reagenz enthalten der Probenpuffer und die Kontrollen Na-Azid; der Waschpuffer Bromonitrodioxan und das Konjugat Methylisothiazolon / Bromonitrodioxan. Das Substrat enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die Stopplösung, 0,2 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ist sauer und ätzend.
- Diese Reagenzien sind giftig, wenn sie aufgenommen werden. Daher müssen die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung gefährlicher Chemikalien getroffen werden. Jeden Körperkontakt vermeiden, Handschuhe und Schutzbrille tragen. Sollte dennoch Haut (oder Schleimhaut) von einem Reagenz benetzt werden, die betroffene Stelle sofort mit viel Wasser abspülen. Nicht mit dem Mund pipettieren. Die Reagenzien gemäß lokalen / nationalen Vorschriften entsorgen.
- Na-Azid kann mit Metallrohren reagieren und explosive Azide bilden. Beim Entsorgen mit Wasser nachspülen, um eine Akkumulation zu verhindern.
- Die Kontrollen enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Sie wurden daraufhin geprüft, ob Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Ag, Hepatitis B-Oberflächen (HBs)-Ag und Antikörper gegen HIV 1/2 und Hepatitis C-Virus (HCV) vorliegen und zeigten negative Resultate; entweder in einem FDA-zugelassenen oder einem CE-konformen Test, entsprechend der Europäischen Richtlinie 98/79/EC.
- Allerdings kann kein Test garantieren, dass Material humanen Ursprungs tatsächlich nicht infektiös ist. Die Präparate sollten daher als potenziell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, ebenso wie die Proben (und Reste von ihnen); gemäß CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA)- oder anderen lokalen / nationalen Richtlinien zu Laborsicherheit und Dekontaminierung.

### 3 TESTPRINZIP

Die Kavitäten der Festphase sind beschichtet mit einer ausgewogenen Mischung der o.g. Autoantigene. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion: Antigen-spezifische Antikörper aus der Probe binden an ihr jeweiliges immobilisiertes Antigen; es bildet sich der Antigen-Antikörper-Komplex. Nicht-gebundene Probenbestandteile werden anschließend von der Festphase gewaschen.
2. Reaktion: Ein zweiter, gegen human-IgG gerichteter und mit Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper wird zugesetzt. Dieses Konjugat bindet seinerseits an den Antigen-Antikörper-Komplex. Überschüssiges Konjugat wird anschließend von der Festphase gewaschen.
3. Reaktion: Der Enzym-markierte Komplex setzt ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt um. Das Ausmaß der Farbentwicklung spiegelt summarisch die Konzentration aller Antigen-spezifischen Autoantikörper (IgG) in der Probe wider.

### 4 INHALT DES TESTKITS

- a. **1 Mikrowell-Platte**, mit einer Mischung der o.g. Autoantigene beschichtet. Hermetisch in einem Beutel aus laminiertes Metallfolie verpackt, zusammen mit Trockenmittel. Die Platte besteht aus 12 Streifen, die sich jeweils in 8 Einzelkavitäten teilen lassen.

MWP	12x8
-----	------

- b. **Probenpuffer**, 100 mL, gebrauchsfertig, orange gefärbt.  
Enthält Tris-gepufferte Saline (TBS), bovines Serumalbumin (BSA), Tween und Na-Azid.

BUF	SPL
-----	-----

- c. **Waschpuffer**, 100 mL, 10x-Konzentrat, blau gefärbt.  
Enthält TBS, Tween und Bromonitrodioxan:

BUF	WASH	10x
-----	------	-----

- d. **Negative und positive Kontrolle**, je 3,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot gefärbt.  
Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.

CONTROL	-	CONTROL	+
---------	---	---------	---

- e. Anti-human IgG HRP **Konjugat**, 14 mL, gebrauchsfertig, rot gefärbt.  
Gepufferte Lösung mit stabilisierendem Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan.

CONJ	IgG
------	-----

- f. **Substrat**, 14 mL, gebrauchsfertig, farblos.  
Enthält eine gepufferte Lösung von TMB und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, abgefüllt in einem Licht-undurchlässigen Gefäß.

SUBS	TMB
------	-----

- g. **Stopplösung** (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 14 mL, farblos, gebrauchsfertig.  
Vorsicht: Schwefelsäure ist ätzend.

SOLN	STOP
------	------

- h. Gebrauchsinformation

- i. Chargen-spezifisches Analysenzertifikat

### 5 BENÖTIGTES, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIAL

- a. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- b. Messzylinder, 1000 mL
- c. Reagenzröhrchen für die Probenverdünnung (Transfer-Röhrchen im Mikrowell-Plattenformat empfohlen)
- d. Pipetten für 10, 100 und 1000 µL (1- und 8-Kanalpipetten empfohlen)
- e. Mikrowell-Plattenwascher (optional)
- f. Mikrowell-Plattenphotometer mit 450 nm-Filter
- g. ELISA Auswertungsprogramm (empfohlen)

### 6 AUFBEWAHRUNG DES TESTKITS

Den Testkit bei 2 °C - 8 °C lagern. Er ist bis zum Verfallsdatum einsetzbar, das auf dem Etikett der Verpackung angegeben ist; danach nicht mehr verwenden.

## 7 REAGENZIIEN- UND PROBENVORBEREITUNG / ANFORDERUNGEN AN DIE PROBEN

Wegen möglicherweise unterschiedlichen Lagerungs- und Transport-Bedingungen dürfen korrespondierende Komponenten aus verschiedenen Kits nicht vermischt oder gegeneinander ausgetauscht werden.

Wird der Kit in mehreren Portionen verwendet, sollten nur die für den aktuellen Test benötigten Volumina den verschiedenen Fläschchen entnommen werden. Dabei ist ganz wichtig, dass es zu keinerlei Kreuzkontamination zwischen den Reagenzien kommt! Nur saubere Pipetten verwenden; Reagenzienreste nicht in die Original-Fläschchen zurückgeben.

- a. Den Beutel mit der Festphase akklimatisieren lassen, erst dann öffnen. Die für den aktuellen Test evtl. nicht benötigten Kavitäten sofort aus dem Gitterrahmen nehmen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Folienbeutel zurücklegen. Diesen hermetisch verschließen und bis zur künftigen Verwendung weiter gekühlt lagern.
- b. Das Waschpuffer-10x-Konzentrat (100 mL, blau) wird mit 900 mL deionisiertem Wasser verdünnt und gut durchmischt. Gekühlt bei 2 °C - 8 °C ist diese Lösung für mehrere Wochen stabil.

### a) Präparation der Proben:

Patientenproben als potenziell infektiös betrachten und entsprechend vorsichtig handhaben.

**Neben Serum ist auch EDTA-, Citrat- oder Heparin-behandeltes Plasma als Probenmaterial geeignet.**

Anforderungen an die Proben: Stark lipämische oder hämolysierte Proben sowie mikrobiell verunreinigte Seren können falsche Ergebnisse liefern und sollten daher vermieden werden.

Die Proben werden mit dem Probenpuffer **1:100** in Reagenzröhrchen verdünnt;  
z.B.: 10 µL Serum + 990 µL Probenpuffer. Die Verdünnungen gut durchmischen.

Zum schnellen Dispensieren während des Testablaufs empfiehlt es sich, Kontrollen und Proben in Transferröhrchen (Mikrowell-Format) vorzulegen. Dann kann mit einer 8-Kanal-Pipette gearbeitet werden.

Proben, die nicht sofort analysiert werden können, müssen bei 2 °C - 8 °C gelagert und innerhalb von 3 Tagen gemessen werden. Ist eine längere Lagerung vorgesehen, so müssen sie eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Auftaute Proben vor dem Verdünnen durchmischen.

## 8 DURCHFÜHRUNG DES TESTS

### 8.1 Manuelle Durchführung

Bevor der Test gestartet wird, müssen alle Kitkomponenten Raumtemperatur (23 °C ± 3 °C) angenommen haben.

Um das bestmögliche Ergebnis (d.h. ein maximales Verhältnis zwischen spezifischem und Hintergrund-Signal) zu erreichen, ist **sorgfältiges Waschen** ganz wesentlich (Schritte a, c und e). Insbesondere ist es wichtig, die **Waschlösung vollständig aus den Kavitäten zu entfernen**. Dazu klopft man die Festphase auf Saugpapier aus. Automatische Wascher müssen daraufhin geprüft werden, ob ihre Ergebnisse mit denen vergleichbar sind, die mit manuellem Waschen erzielt werden.

- a. Unmittelbar vor Testbeginn die Kavitäten einmal mit je **350 µL Waschpuffer** füllen, ca. 10 Sekunden einwirken lassen und wieder entleeren.
- b. Die **Kontrollen** und die **verdünnten Proben** zügig in die Kavitäten dispensieren; **100 µL** pro Kavität. Doppelbestimmungen sind zu empfehlen.

*Die Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur (23 °C ± 3 °C) inkubieren.*

- c. Die Kavitäten 4x wie in Schritt a waschen.
- d. Je **100 µL Konjugat** zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren.

*Inkubieren wie in Schritt b.*

- e. Waschschrift c wiederholen.
- f. Je **100 µL Substrat** zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren.

*Inkubieren wie in Schritt b.*

Das Substrat ist lichtempfindlich; direkte Belichtung (bspw. Sonnenlicht) während der Inkubation vermeiden.

- g. Je **100 µL Stopplösung** zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren; in derselben Reihenfolge wie beim Substrat: Farbumschlag von blau nach gelb.  
Die Festphase für ca. 10 Sekunden vorsichtig agitieren, am besten auf einem Schüttler.
- h. Die Platte sofort im Mikrowell-Plattenphotometer bei 450 nm messen.

Überschüssige Reagenzien weiter bei 2 °C - 8 °C lagern, wenn sie später noch einmal verwendet werden sollen.

## 9 AUSWERTUNG UND QUALITÄTSKONTROLLE

Der Test wird qualitativ ausgewertet: Die Absorption der Proben wird verglichen mit der grenzwertigen Absorption (= cut-off). Die cut-off-Absorption wird bestimmt anhand der positiven Kontrolle, die gleichzeitig als Kalibrator fungiert, gemäß der Formel:

$$OD_{\text{Cut-off}} = OD_{\text{Kalibrator}} \times \text{Faktor}$$

Der Faktor hängt von der Kit-Charge ab und ist im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben. Das Analysen-Zertifikat liegt jedem Kit bei. Beispiel:

$$\begin{aligned} OD_{\text{Kalibrator}} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{Faktor} &= 0,35 \\ OD_{\text{Cut-off}} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie hoch positiv eine bestimmte Probe ist, kann man nach folgender Formel ihre Ratio berechnen:

$$\text{Ratio} = OD_{\text{Probe}} / OD_{\text{Cut-off}}$$

*Beispiel:*

$$\begin{aligned} OD_{\text{Cut-off}} &= 438 \text{ mOD} \\ OD_{\text{Probe}} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{Ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

### Qualitätskontrolle:

Die negative und die positive Kontrolle (Kalibrator) dienen der Überprüfung des Tests. Ihre jeweils akzeptablen Bereiche sind im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben. Die Messwerte der Kontrollen müssen innerhalb der Toleranzgrenzen liegen; ansonsten sind die Ergebnisse des Tests ungültig.

## 10 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE / GRENZEN DER METHODE

Auf der Basis einer Serienmessung von Blutspender- und Positiv-Seren (s.u.) schlagen wir für die Beurteilung von Patientenseren vor:

	<b>Ratio</b>
normaler (negativer) Bereich	< 0,82
Cut-off	1,00
grenzwertiger Bereich	0,82 - 1,20
positiver Bereich	> 1,20

Diese Spezifikationen sind nur als Anhaltspunkt zu verstehen. Zu ihrer Überprüfung sollten bei jedem Test Normalseren mitgeführt werden.

Ein **negatives Ergebnis** zeigt an, dass der Patient vermutlich keinen erhöhten Titer an IgG-Antikörpern gegen die eingangs genannten Antigene aufweist. Folglich liegt vermutlich keine systemische rheumatische Erkrankung vor, kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Ein **positives Ergebnis** sollte als Hinweis auf eine der o.g. Erkrankungen interpretiert werden. Im nächsten Schritt sollte die Spezifität des ursächlichen Antikörpers bestimmt und damit die assoziierte Autoimmun-Erkrankung identifiziert werden; bspw. mit einem differenzierenden Profil-ELISA.

Proben mit **grenzwertigen Resultaten** sollten als zweifelhaft betrachtet und als solche berichtet werden. Es empfiehlt sich, nach etwa 2 Wochen eine weitere Probe zu messen, parallel mit der zuerst entnommenen, um eine mögliche Änderung des Antikörper-Titers zu erfassen.

Wie bei jedem serologischen Test sollten dessen Resultate nicht isoliert interpretiert werden, sondern im Zusammenhang mit den Symptomen des Patienten und anderen diagnostischen Kriterien.



## 11 TESTCHARAKTERISTA

### 11.1 Standardisierung

Der Test wird mit einem gereinigten Serumpräparat standardisiert, das IgG-Antikörper gegen jedes der immobilisierten Autoantigene enthält. Es bildet das Ausgangsmaterial beider Testkontrollen. Das Verhältnis der Antikörper wurde so eingestellt, dass jeder von ihnen etwa denselben Anteil zum Gesamtsignal beisteuert.

Das Präparat wurde seinerseits kalibriert an einem Satz monospezifisch-positiver Seren, der ausschließlich für diesen Zweck reserviert ist. Der Grad der Reaktivität einer Probe wird als Pauschalratio angegeben, wie oben ausgeführt.

### 11.2 Analytische Spezifität

Der Test weist spezifisch humane IgG-Antikörper nach, die gegen die in Abschnitt 1 genannten Antigene gerichtet sind. Er wurde u.a. anhand der allgemein zugänglichen, humanen Referenzseren des "Center of Disease Control" (CDC, Atlanta, USA) validiert. Folgende Resultate (Ratio-Werte) sind typisch:

Serum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC-Resultat	ds-DNA	SS-B/La	--	U1-RNP	Sm	--	SS-A/Ro	--	Scl-70	Jo-1
Immunfluoresz.	homogen	speckled	speckled	--	--	nucleolar	--	centromere	--	--
Ratio	2,1	8,7	7,6	3,3	8,4	1,0	6,2	0,3	6,6	8,2

#### Anmerkung:

Der korrespondierende ANA Profil 8 ELISA, der zwischen den Antigenen diskriminiert, zeigt, dass Serum No. 1 nicht nur mit dsDNA, sondern auch mit Sm reagiert. Serum No. 6 weist Ratiowerte  $\leq 1$  bzgl. aller Einzelantigene auf. Serum No. 8 reagiert stark mit Centromer-Protein B, das jedoch nicht zum Antigenassortiment des vorliegenden ANA Screen 6 ELISA gehört.

### 11.3 Nachweisgrenze (analytische Sensitivität):

Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die der gemittelten Absorption des Probenpuffers entspricht, zu der die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu  $< 0,4$  (Ratio; n = 24) bestimmt.

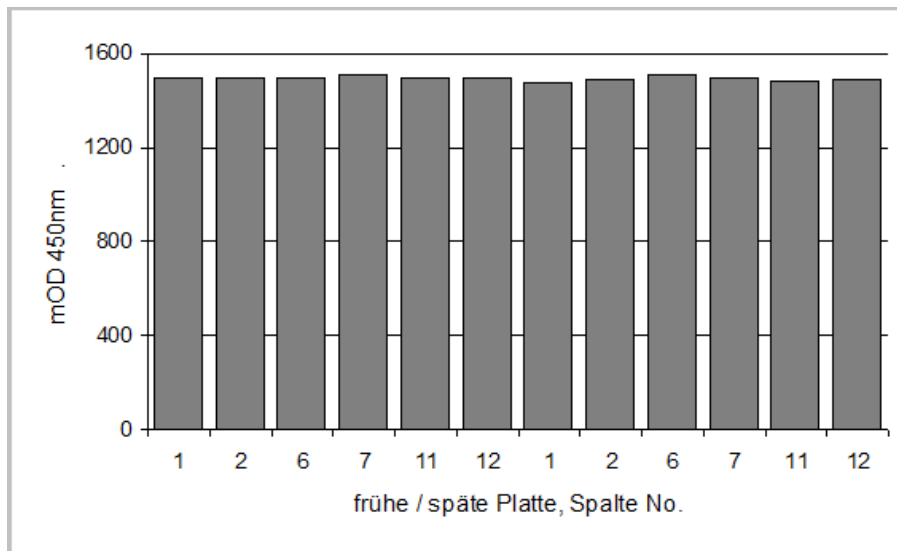
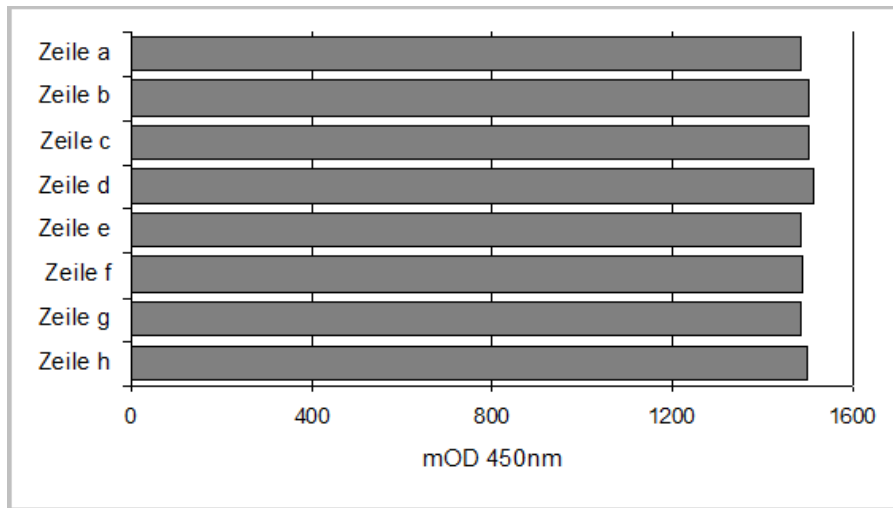
Empfohlener Messbereich:  $0,5 < \text{Ratio} < 6$

### 11.4 Festphasen-Homogenität

Dieser Parameter ist regulärer Bestandteil der QC jeder Produktions-Charge. Die Homogenität wird bestimmt durch 288-fache Messung einer IgG-positiven, aber nicht sättigenden Probe auf 3 ausgewählten Platten.

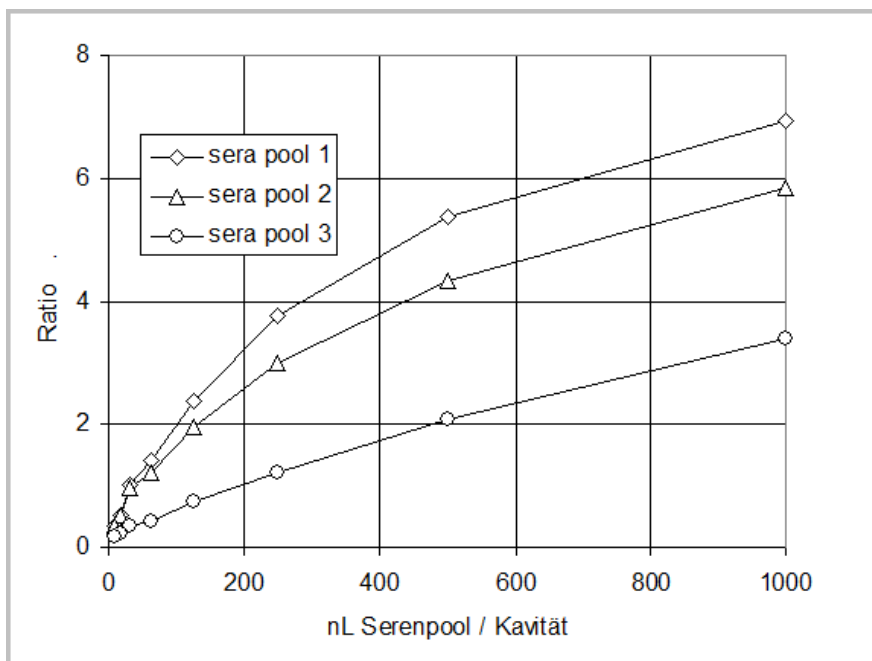
Akzeptanz-Kriterium: mOD-Variationskoeffizient (VK) über die Platten  $< 8\%$ . Die folgende Abbildung zeigt einen repräsentativen Auszug einer solchen Analyse (Ch.-Bez. der Festphase: 2308I).

Platte	früh (n/10)						spät (9n/10)						MW	VK %
	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11	12		
Zeile a	1464	1480	1490	1527	1476	1475	1490	1492	1495	1461	1478	1525	1488	1,4
Zeile b	1514	1522	1528	1511	1487	1489	1472	1480	1504	1534	1484	1519	1504	1,4
Zeile c	1488	1520	1518	1531	1524	1509	1464	1503	1529	1506	1463	1484	1503	1,6
Zeile d	1517	1500	1518	1524	1533	1529	1497	1508	1528	1522	1461	1491	1511	1,4
Zeile e	1504	1492	1499	1472	1473	1503	1471	1483	1498	1501	1497	1457	1488	1,1
Zeile f	1480	1482	1468	1505	1478	1498	1438	1502	1503	1488	1510	1515	1489	1,4
Zeile g	1493	1465	1478	1493	1512	1507	1457	1460	1481	1483	1475	1500	1484	1,2
Zeile h	1545	1516	1504	1519	1517	1496	1466	1487	1504	1497	1468	1457	1498	1,7
MW	1501	1497	1500	1510	1500	1501	1469	1489	1505	1499	1480	1494	<b>1495</b>	
VK %	1,7	1,4	1,4	1,3	1,6	1,1	1,3	1,0	1,1	1,5	1,1	1,8		<b>1,5</b>



### 11.5 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Um diese Eigenschaft des ELISAs zu bestimmen, wurden mehrere Pools individueller Seren mit heterogener Reaktivität in serieller 2-facher Verdünnung gemessen. Die Abbildung unten zeigt ein typisches Ergebnis. Eine annähernd lineare Beziehung zwischen Probenkonzentration und resultierender Ratio beschränkt sich auf Ratio-Werte < 2. Dies wird durch die qualitative Auswertung verursacht (vgl. Abschnitt 9); im Unterschied zu quantitativen ELISAs, die mit einer Standardkurve ausgewertet werden.



## 11.6 Präzision

Um die Präzision des Tests zu ermitteln, wurde die Variabilität der Ergebnisse unter folgenden Bedingungen ermittelt:

- innerhalb eines Assays und zwischen 3 Assays,
- zwischen 3 Anwendern und
- zwischen 2 Kit-Chargen.

### a. Intra- und inter-Assay Variabilität (n = 24 bzw. 72)

Probe	Mittelwert Ratio	Variabilität (VK, %)	
		Intra-Assay	Inter-Assay
1	1,2	3,0	3,3
2	3,2	2,0	3,0
3	4,9	1,8	4,1

### b. Operator-zu-Operator Variabilität (n = 12)

Probe	Mittelwert Ratio	Variabilität (VK, %)
1	1,2	1,7
2	3,2	1,7
3	4,7	1,8

### c. Variabilität zwischen 2 Kit-Chargen (n = 6)

Probe	Mittelwert Ratio	Variabilität (VK, %)
1	1,0	11,9
2	2,9	11,9
3	4,4	9,2

## 11.7 Häufigkeits-Verteilung der ANA (IgG)

Dies wurde analysiert mit einem Serenkollektiv von Blutspendern, gleichmäßig nach Geschlecht und Alter verteilt, und mit einem Kollektiv von Seren, die mit unabhängigen Methoden (bspw. monospezifische, CE-konforme Referenz-ELISAs, Immunfluoreszenz-Assays (IFA)) für mindestens einen Parameter positiv gefunden worden oder klinisch definiert waren.

Folgende summarische Verteilung der Analyte wurde beobachtet (MW = Mittelwert, s = Standardabweichung):

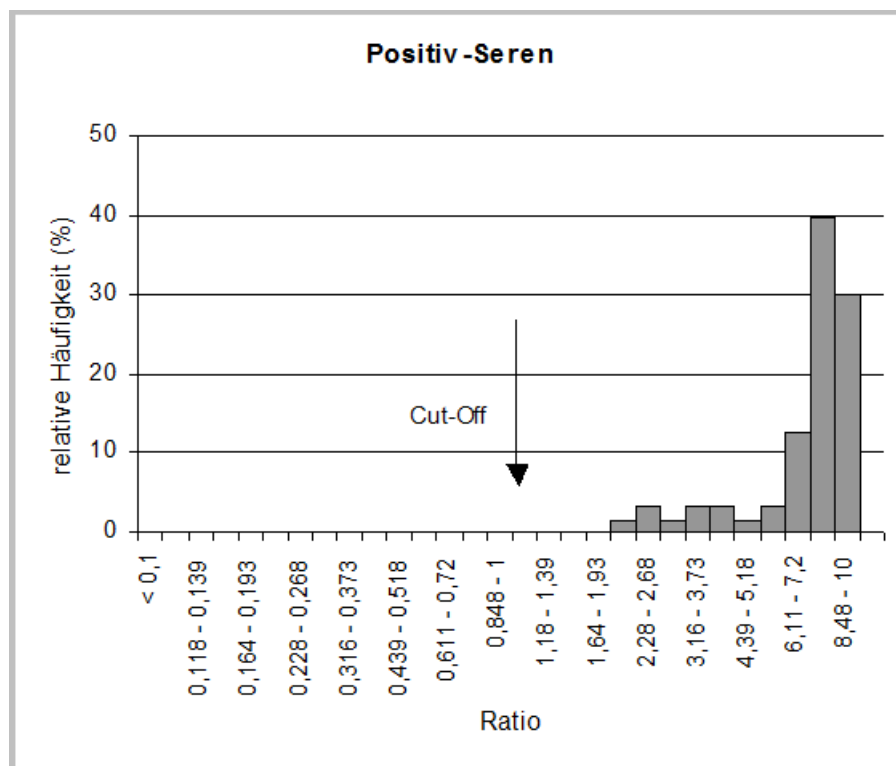
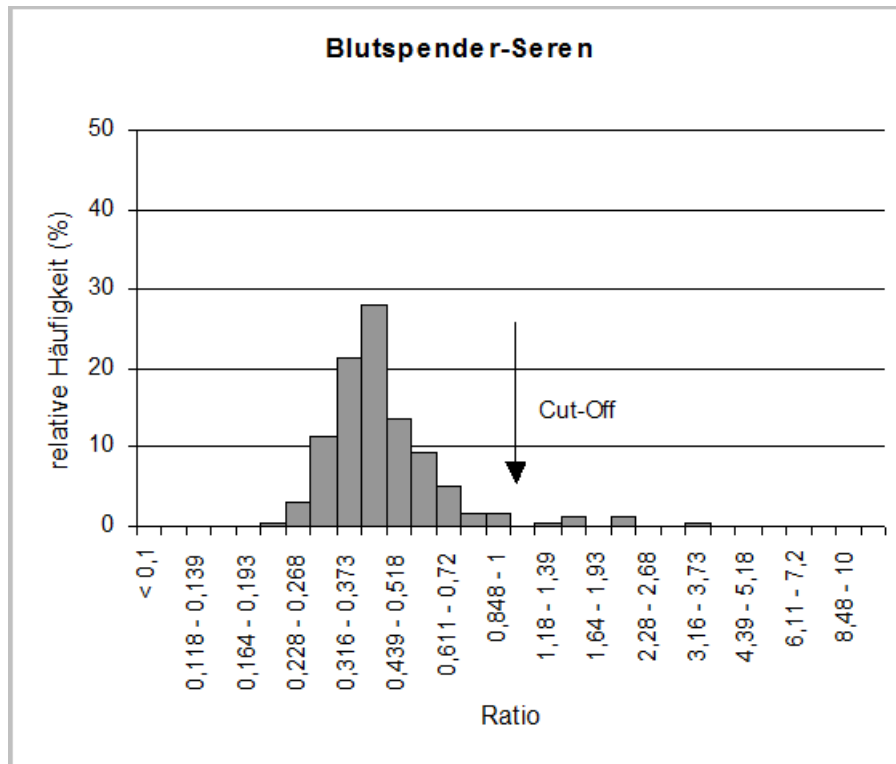
### Blutspender-Seren

n:	160
MW:	Ratio = 0,49
MW + s:	Ratio = 0,84
MW + 2s:	Ratio = 1,19
Median:	Ratio = 0,40
95. Perzentile:	Ratio = 0,94

### positive Seren

n:	63
MW:	Ratio = 7,3
MW - s:	Ratio = 5,4
MW - 2s:	Ratio = 3,5
Median:	Ratio = 7,8
5. Perzentile:	Ratio = 2,9

Der Cut-off des ANA Screen 6 ELISAs wurde mittels ROC-Analyse dieser Daten nach (6) bestimmt. Aus den hier gezeigten Daten ergibt sich eine diagnostische Spezifität und Sensitivität des Tests von etwa 96 bzw. annähernd 100%. Diese Werte gelten nur für die gemessenen Seren; andere Kollektive können abweichende Ergebnisse erzielen.



## 12 GARANTIE UND HAFTUNG

DRG garantiert, dass das ausgelieferte Produkt gründlich getestet wurde, um sicherzustellen, dass es seine Spezifikationen erfüllt und der hier gegebenen Beschreibung entspricht. Weitergehende Garantien werden nicht gegeben. Die hier genannten Testcharakteristika wurden mit der angegebenen Methode ermittelt. Jede Änderung der Methode kann die Ergebnisse beeinflussen. In einem solchen Fall verweigert DRG jede Haftung, ob ausgesprochen, impliziert oder gesetzlich. Darüber hinaus kann DRG keinerlei Haftung für Schäden übernehmen, die aufgrund einer unkorrekten Lagerung oder Anwendung des Produktes entstanden sind; direkt, indirekt oder als Konsequenz.

**13 KURZANLEITUNG**

- a. Die Proben 1/100 in Probenpuffer (100 mL, gebrauchsfertig, orange) verdünnen und durchmischen.
- b. Das 10x-Konzentrat des Waschpuffers (100 mL, blau) mit Wasser verdünnen und durchmischen.
- c. Die Kavitäten der Festphase einmal mit je 350 µL Waschpuffer waschen.  
100 µL der Kontrollen (3,0 mL, gebrauchsfertig, grün und rot) und der verdünnten Proben in die Kavitäten der Festphase dispensieren. Doppelbestimmungen werden empfohlen.  
30 Minuten bei Raumtemperatur ( $23\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ ) inkubieren.
- d. Die Kavitäten 4x mit je 350 µL Waschpuffer waschen.
- e. Je 100 µL des Konjugats (14 mL, gebrauchsfertig, rot) in die Kavitäten pipettieren.  
Inkubieren wie in Schritt c.
- f. Waschschrift d wiederholen.
- g. Je 100 µL des Substrats (14 mL, gebrauchsfertig, in einem schwarzen Fläschchen) in die Kavitäten pipettieren.  
Inkubieren wie in Schritt c.  
Dann je 100 µL Stopplösung (14 mL, gebrauchsfertig, farblos) zusetzen und die Platte kurz schütteln.
- h. Sofort die Absorption bei 450 nm messen.
- i. Auswertung:  
Die cut-off-Absorption ermitteln, indem die Absorption der positiven Kontrolle mit dem Faktor multipliziert wird, der im Analysen-Zertifikat angegeben ist. Dann die Ratio-Werte der Proben berechnen, indem ihre Absorption durch die cut-off-Absorption dividiert wird.

## 1 INTRODUZIONE E DESCRIZIONE GENERALE

La presenza di auto-anticorpi contro vari antigeni intracellulari (anticorpi anti-nucleo, ANA) è caratteristica delle malattie sistemiche reumatiche autoimmuno-mediate del tessuto connettivo (1, 2, 3, 4). Queste patologie comprendono lupus eritematoso sistemico (LES), malattia mista del tessuto connettivo (MMTC), sindrome di Sjögren (SS) A e B, sclerosi sistemica progressiva (SSP), sclerodermia) e polimiosite (PM).

La diagnosi delle condizioni di cui sopra è spesso difficile, dinanzi ai sintomi sovrapposti, pertanto è solitamente avvalorata dalla misurazione dei rispettivi anticorpi. 6 autoantigeni riconosciuti specificamente da tali anticorpi vengono immobilizzati sulla fase solida del presente saggio immunoassorbente legato ad enzimi (ELISA):

antigene	fonte	patologia	prevalenza autoanticorpale (5)
RNP (proteine A, C, 68kDa)	ricombinante	MMTC	95 %
		LES	30 - 40%
		PM	14%
		SS	4%
Sm (proteine B, B', D)	timo bovino	LES	12 - 39%
		MMTC	7%
SS-A/Ro (proteina 60kDa)	timo bovino	SS	60 - 100%
		LES	45 - 50%
		MMTC	15 - 30%
		PSS	5 - 7%
		PM	5 - 7%
SS-B/La	ricombinante	SS	30 - 90%
		LES	15 - 30%
		MMTC	5 - 15 %
Sci-70 (topoisomerasi 1 del DNA)	ricombinante	PSS	20 - 76%
Jo-1 (istidil-tRNA-sintetasi)	ricombinante	PM	20 - 40%

Il test è realizzato per la determinazione qualitativa e sommaria dei rispettivi autoanticorpi (IgG) nel siero o plasma umano (vedere la sezione 7), non per la loro differenziazione. È concepito quale saggio di controllo iniziale, per la generale diagnosi delle condizioni sopra riportate. Si tratta di un test rapido (tempo di incubazione 30 / 30 / 30 minuti) e versatile (fase solida divisibile, reagenti pronti per l'uso). Le prestazioni del saggio sono verificate mediante un controllo negativo e un controllo positivo. Il controllo positivo funge anche da calibratore per la valutazione del dosaggio.

## 2 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Il kit di test è esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*, non per uso interno o esterno nell'uomo o negli animali. Può essere utilizzato solo da personale addestrato.
- Non utilizzare i reagenti oltre le loro date di scadenza. Si raccomanda vivamente il rispetto del protocollo.
- Il tampone campione e i controlli contengono sodio azide come conservante. Il tampone di lavaggio contiene bromonitrodiossano e il coniugato metilisotiazolone / bromonitrodiossano come conservante. Il substrato contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La soluzione di arresto, 0,2 M di acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), è acida e corrosiva.
- I suddetti reagenti possono essere tossici se ingeriti. Attenersi alle precauzioni di routine per la manipolazione delle sostanze chimiche nocive. Evitare qualunque contatto con il corpo; indossare guanti e protezioni oculari. Se uno dei reagenti viene a contatto con la pelle o con le mucose, lavare copiosamente con acqua. Non pipettare mai con la bocca. Smaltire secondo modalità conformi alle norme locali/nazionali vigenti.
- L'azide sodica può reagire con le tubature in piombo e rame, formando azidi metalliche esplosive. Durante lo smaltimento, lasciare scorrere grandi quantità di acqua a scanso dell'accumulo di azidi.
- I controlli contengono ingredienti di origine umana. Sono risultati negativi nelle analisi per la presenza dell'antigene del virus dell'immunodeficienza umana (HIV), l'antigene di superficie dell'epatite B, gli anticorpi anti-HIV 1-2 e gli anticorpi anti-virus dell'epatite C (HCV), nell'ambito di test approvati dalla FDA statunitense o conformi alla Direttiva europea 98/79/CE.
- Tuttavia, nessun test noto è in grado di escludere del tutto il rischio di infezione con gli emoderivati umani. Di conseguenza, maneggiarli come agenti potenzialmente infettivi e smaltirli in modo opportuno. Per la sicurezza in sede di laboratorio e le procedure di decontaminazione, consultare le linee guida promulgate dal CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA) o da altri enti locali/nazionali.

### 3 PRINCIPIO DELLA METODICA

I pozzetti della fase solida sono rivestiti con una miscela equilibrata dei suddetti autoantigeni. Su tale superficie hanno luogo le reazioni immunologiche seguenti:

- 1<sup>a</sup> reazione: gli anticorpi antigene-specifici presenti nel campione si legano all'antigene immobilizzato, formando il complesso antigene-anticorpo. In un secondo tempo, i componenti non legati del campione sono asportati mediante lavaggio dalla fase solida.
- 2<sup>a</sup> reazione: viene aggiunto un secondo anticorpo, diretto contro gli anticorpi anti-IgG umane e coniugato con perossidasi di rafano (HRP). Questo coniugato si lega al complesso. In seguito, il coniugato in eccesso viene eliminato mediante lavaggio dalla fase solida.
- 3<sup>a</sup> reazione: il complesso marcato con enzima trasforma un substrato incolore in un prodotto di colore blu. L'intensità della colorazione rispecchia la concentrazione di autoanticorpi antigene-specifici (IgG) presente nel campione.

### 4 CONTENUTO DEL KIT

- a. **1 piastra per pozzetti**, rivestita con una miscela degli antigeni sopra riportati, confezionata ermeticamente in busta in lamina di alluminio con materiale essiccante. La piastra consta di 12 strisce, ognuna divisibile in 8 singoli pozzetti.

MWP	12x8
-----	------

- b. **Tampone campione**, 100 mL, pronto per l'uso, colore arancione.  
Contiene soluzione fisiologica Tris-tamponata (TBS), sieroalbumina bovina (BSA), Tween e sodio azide.

BUF	SPL
-----	-----

- c. **Tampone di lavaggio**, 100 mL, concentrato 10x, colore blu.  
Contiene TBS, Tween e bromonitrodiossano.

BUF	WASH	10x
-----	------	-----

- d. **Controllo negativo e controllo positivo**, 3,0 mL ciascuno, pronti per l'uso, rispettivamente di colore verde e rosso.  
Contengono TBS, BSA, Tween e Na-azide.

CONTROL	-	CONTROL	+
---------	---	---------	---

- e. **Coniugato HRP anti-IgG umane**, 14 mL, pronto per l'uso, colore rosso.  
Soluzione tamponata contenente proteine stabilizzatrici, metilisotiazolone e bromonitrodiossano.

CONJ	IgG
------	-----

- f. **Soluzione substrato**, 14 mL, pronta per l'uso, incolore. Contiene una soluzione tamponata di TMB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  
Confezionata in flaconcino fotoprotetto

SUBS	TMB
------	-----

- g. **Soluzione di arresto** (0,2 M di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 14 mL, incolore, pronta per l'uso.  
Attenzione: l'acido solforico è corrosivo.

SOLN	STOP
------	------

- h. Istruzioni per l'uso  
i. Certificato di analisi per il lotto specifico

### 5 MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Acqua deionizzata o distillata
- Beuta graduata, 1000 mL
- Provette per la diluizione del campione (si consigliano provette di trasferimento nel formato per piastre di pozzetti)
- Pipette per 10, 100 e 1000 µL (si raccomanda di utilizzare pipette a 1 e a 8 canali)
- Apparecchiatura per lavaggio di pozzetti (facoltativa)
- Fotometro per piastra di pozzetti con filtro di 450 nm
- Programma di valutazione ELISA (raccomandato)

### 6 CONSERVAZIONE DEL KIT

Conservare a 2 °C - 8 °C. Il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

## 7 PREPARAZIONE DI REAGENTE E CAMPIONE / REQUISITI PER I CAMPIONI DA TESTARE

Non scambiare né mischiare i componenti di kit differenti, per via della possibile diversità delle loro condizioni di spedizione o di conservazione.

Se il kit deve essere utilizzato per più test, è necessario prelevare solo la quantità di reagenti attualmente necessaria. È molto importante che non ci sia una contaminazione incrociata tra i reagenti! Utilizzare solo pipette pulite e non restituire i residui di reagente nel flacone originale.

- a. Prima di aprire la busta della fase solida, il prodotto deve essere portato a temperatura ambiente. Rimuovere i pozzetti in eccesso dal supporto e rimmetterli immediatamente nella busta, con il materiale essiccante. Richiudere ermeticamente la busta e refrigerarla per l'uso futuro.
- b. Diluire con il tampone di lavaggio concentrato 10x (100 mL, colore blu) con 900 mL di acqua deionizzata. Miscelare a fondo. Il tampone diluito è stabile per diverse settimane, se refrigerato (2 °C - 8 °C).

- c. Preparazione dei campioni:

Maneggiare i campioni dei pazienti come materiali potenzialmente infettivi.

**Oltre al siero, anche il plasma trattato con EDTA, citrato o eparina è un materiale campione adatto.**

Requisiti per i campioni: campioni altamente lipemici, emolizzati o presentanti contaminazione microbica possono portare a risultati erronei e devono essere evitati.

Preparare i campioni secondo le consuete tecniche di laboratorio e diluirli in rapporto **1/100**, per es. 10 µL di siero / plasma + 990 µL di tampone campione. Miscelare a fondo.

Per una rapida distribuzione durante il test, si raccomanda di preparare i controlli e i campioni in provette di trasferimento per pozzetti. Questo consente di utilizzare una pipetta a 8 canali nel corso del saggio.

Se i campioni non vengono testati immediatamente, conservarli a 2 °C - 8 °C e procedere al saggio entro 3 giorni. Per periodi più lunghi di conservazione, si raccomanda una temperatura di -20 °C o inferiore. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento dei campioni. I campioni scongelati devono essere miscelati prima della diluizione.

## 8 PROCEDURA DI TEST

### 8.1 Metodica manuale

Prima di procedere al saggio, tutti i componenti del kit devono essere portati a temperatura ambiente (23 °C ± 3 °C).

Per i migliori risultati, ossia il massimo rapporto tra i segnali specifici e di fondo, è fondamentale un **attento lavaggio** (come descritto ai punti (a), (c) ed (e)). È **fondamentale eliminare completamente la soluzione di lavaggio**. Per farlo, picchettare con fermezza la piastra su vari strati sovrapposti di carta assorbente. Le apparecchiature di lavaggio automatico devono essere verificate sulla base dei risultati ottenuti con il lavaggio manuale.

- a. Immediatamente prima dell'uso, lavare una sola volta la fase solida:  
immettere in ogni pozzetto **350 µL di tampone di lavaggio**, lasciarlo per circa 10 secondi nei pozzetti, quindi rimuoverlo.
- b. Distribuire rapidamente nei pozzetti i **controlli** e i **campioni diluiti**; **100 µL** per pozzetto.  
Si raccomandano misurazioni in duplicato.  
*Incubare la piastra per 30 minuti a temperatura ambiente (23 °C ± 3 °C).*
- c. Lavare 4 volte i pozzetti, come descritto al punto (a).
- d. Distribuire rapidamente (e preferibilmente con una pipetta a 8 canali) il **coniugato**; **100 µL** per pozzetto.  
*Incubare la piastra come descritto al punto (b).*
- e. Ripetere lo stadio di lavaggio al punto (c).
- f. Distribuire rapidamente (e preferibilmente con una pipetta a 8 canali) la **soluzione substrato**; **100 µL** per pozzetto.  
*Incubare la piastra come descritto al punto (b).*  
Poiché il substrato è fotosensibile, evitare l'esposizione alla luce intensa (per es. luce solare diretta) nel corso dell'incubazione.
- g. Distribuire rapidamente (e preferibilmente con una pipetta a 8 canali) la **soluzione di arresto**; **100 µL** per pozzetto.  
Usare la stessa sequenza del substrato. Il colore cambia da blu a giallo.  
Scuotere la piastra, preferibilmente su un agitatore orbitale, per 10 secondi circa.
- h. Leggere immediatamente l'assorbanza nel fotometro per piastre di micropozzetti a 450 nm.

Refrigerare i reagenti rimasti in (2 °C - 8 °C), se si desidera utilizzarli nuovamente in un secondo tempo.



## 9 VALUTAZIONE E CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Il saggio è valutato qualitativamente: l'assorbanza dei campioni viene rapportata all'assorbanza borderline (ossia il valore limite) (= assorbanza cut-off). L'assorbanza cut-off è stabilita mediante il controllo positivo, che funge simultaneamente anche da calibratore, in base alla formula:

$$\text{assorbanza borderline} = \text{assorbanza del controllo positivo} \times \text{il fattore}$$

Il fattore dipende dal kit ed è stipulato nel certificato di analisi per il lotto specifico (che corredata ogni kit di test).

Esempio:

$$\begin{aligned} \text{assorbanza del controllo positivo} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{fattore} &= 0,35 \\ \text{assorbanza borderline} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

Per un'indicazione del livello di reattività del campione, viene calcolato il rapporto fra l'assorbanza del campione e l'assorbanza borderline:

$$\text{Rapporto} = \text{assorbanza del campione} / \text{assorbanza borderline}$$

Esempio:

$$\begin{aligned} \text{assorbanza borderline} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{assorbanza del campione} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{rapporto} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

### Controllo della qualità:

Il controllo positivo (calibratore) e il controllo negativo verificano le prestazioni del saggio. I loro intervalli accettabili sono indicati nel certificato di analisi specifico per il lotto. I valori dei controlli devono rientrare negli intervalli indicati; in caso contrario, gli esiti del saggio non saranno validi.

## 10 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI / LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Sulla base della misurazione di un pool di sieri di donatori di sangue e positivi (vedere sotto), per la valutazione del siero dei pazienti si suggerisce:

	<b>Rapporto</b>
range normale (negativo)	< 0,82
cut-off	1,00
range dubbio	0,82 - 1,20
range positivo	> 1,20

Queste specifiche sono fornite a titolo puramente indicativo; per accertarne l'accuratezza, tutte le analisi devono includere campioni paralleli di sieri normali.

Un **esito negativo** del test indica che probabilmente il paziente non presenta livelli innalzati di anticorpi IgG contro gli antigeni elencati all'inizio di queste istruzioni. Pertanto, la presenza di malattia sistemica reumatica è piuttosto improbabile, anche se non può essere esclusa.

Un **esito positivo** del test deve essere considerato indicativo della presenza di una delle malattie citate sopra. Come diagnosi di follow-up, la specificità dell'auto-anticorpo causativo e, di conseguenza, l'identità della malattia autoimmune, devono essere stabilite. Per farlo, è possibile ricorrere a un saggio ELISA con differenziazione del profilo.

I campioni evidenziati risultati fra i valori limite riportati sopra vanno considerati **dubbi** e riferiti come tali. Si raccomanda di prelevare un secondo campione due settimane più tardi, testandolo in parallelo con il primo campione per documentare il possibile cambiamento del titolo anticorpale.

Come per qualunque test sierologico, gli esiti devono essere interpretati alla luce della sintomatologia del paziente e di altri criteri diagnostici.

## 11 CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

### 11.1 Standardizzazione

Il test è standardizzato con un preparato di siero purificato, contenente anticorpi IgG diretti contro ciascuno degli antigeni immobilizzati. Rappresenta la materia prima per entrambi i controlli del test. La percentuale di anticorpi viene regolata in modo tale che ognuno contribuisca approssimativamente alla stessa frazione del segnale complessivo.

Il preparato grezzo è calibrato rispetto a un pool di sieri positivi monospecificamente, riservati solo a questo scopo. Il livello di reattività del campione viene espresso come rapporto sommario (come accennato sopra).

### 11.2 Specificità analitica

Il test consente di determinare in modo specifico la presenza di anticorpi anti-IgG umane diretti contro gli autoantigeni di cui alla sezione 1. È stato validato in base di molteplici criteri, che includono l'uso di sieri umani di riferimento dal Center of Disease Control (CDC; Atlanta, USA) disponibili in commercio. I risultati seguenti (valori di rapporto) costituiscono esiti tipici:

Siero	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Risultato CDC	ds-DNA	SS-B/La	--	U1-RNP	Sm	--	SS-A/Ro	--	Scl-70	Jo-1
immunofluoresc.	omogeneo	a chiazze	a chiazze	--	--	nucleolare	--	centromero	--	--
rapporto	2,1	8,7	7,6	3,3	8,4	1,0	6,2	0,3	6,6	8,2

*Osservazioni:* Il saggio corrispondente ANA Profile 8 ELISA, che differenzia gli antigeni presenti, ha rivelato quanto segue: Il siero n. 1 reagisce non solo con dsDNA, ma anche con Sm. Il siero n. 6 evidenzia valori di rapporto  $\leq 1$  verso la totalità dei singoli antigeni. Il siero n. 8 reagisce marcatamente con la proteina B-centromero, che non è inclusa nel *range* degli antigeni per questo saggio ANA Screen 6 ELISA.

### 11.3 Limite di rilevamento (sensibilità analitica)

Il limite di rilevamento è definito come la concentrazione di analita che corrisponde all'assorbanza media del tampone del campione, più una deviazione standard (s) tripla. È stato determinato come  $< 0,4$  (rapporto; n = 24).

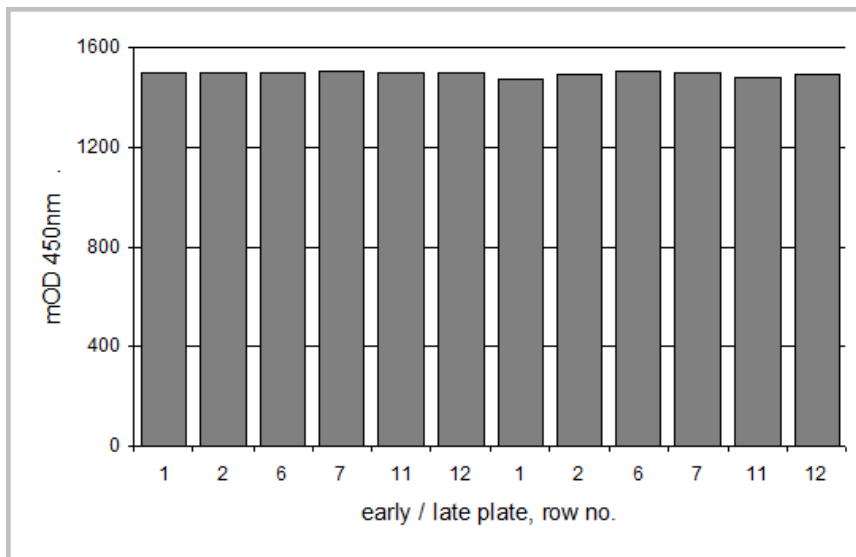
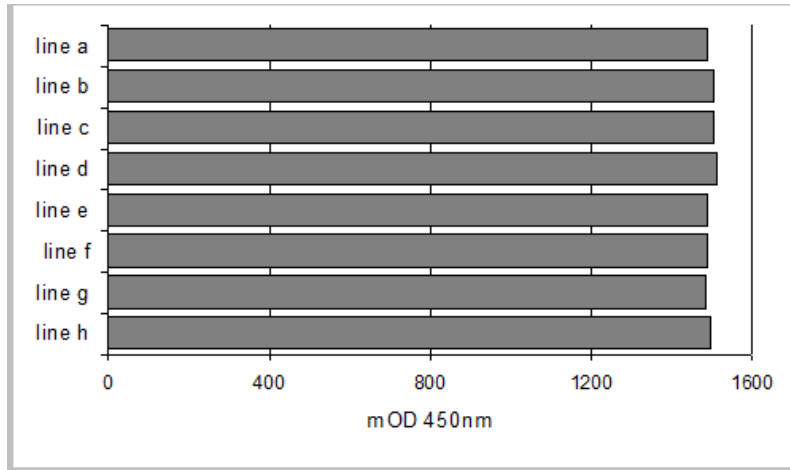
Intervallo di misurazione raccomandato:  $0,5 < \text{rapporto} < 6$

### 11.4 Omogeneità della fase solida

La misurazione dell'omogeneità della fase solida è prevista di prassi nella verifica qualitativa di ciascun lotto di produzione. Viene stabilita con una misurazione di 288 volte di un campione positivo per le IgG ma non saturante, su 3 piastre selezionate.

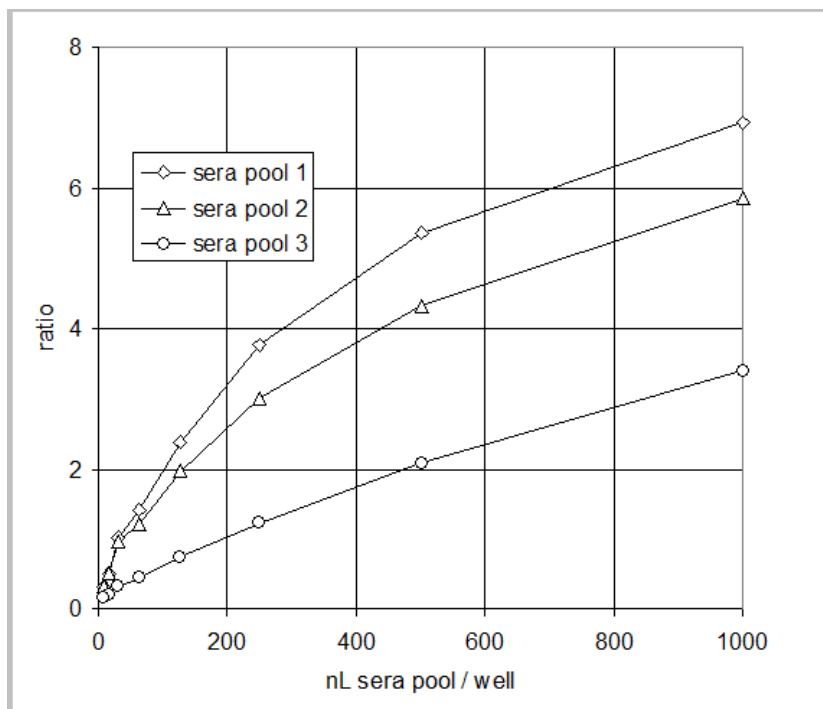
Criterio di approvazione: mOD-coefficiente di variazione (CV) sopra le piastre  $< 8\%$ . La figura sottostante mostra un estratto rappresentativo (lotto 2308I fase solida) di detta analisi.

piastra	precoce (n = 10)						tardivo (9n/10)						media CV%	
	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11	12		
linea a	1464	1480	1490	1527	1476	1475	1490	1492	1495	1461	1478	1525	1488	1,4
linea b	1514	1522	1528	1511	1487	1489	1472	1480	1504	1534	1484	1519	1504	1,4
linea c	1488	1520	1518	1531	1524	1509	1464	1503	1529	1506	1463	1484	1503	1,6
linea d	1517	1500	1518	1524	1533	1529	1497	1508	1528	1522	1461	1491	1511	1,4
linea e	1504	1492	1499	1472	1473	1503	1471	1483	1498	1501	1497	1457	1488	1,1
linea f	1480	1482	1468	1505	1478	1498	1438	1502	1503	1488	1510	1515	1489	1,4
linea g	1493	1465	1478	1493	1512	1507	1457	1460	1481	1483	1475	1500	1484	1,2
linea h	1545	1516	1504	1519	1517	1496	1466	1487	1504	1497	1468	1457	1498	1,7
media	1501	1497	1500	1510	1500	1501	1469	1489	1505	1499	1480	1494	<b>1495</b>	
CV%	1,7	1,4	1,4	1,3	1,6	1,1	1,3	1,0	1,1	1,5	1,1	1,8		<b>1,5</b>



### 11.5 Rapporto dose-risposta

Per valutare questa caratteristica del saggio ELISA sono stati misurati numerosi pool di sieri individuali con reattività eterogenea, doppiamente diluiti. Un esito tipico è mostrato sotto. Un rapporto approssimativamente lineare fra la concentrazione del campione e il rapporto risultante si limita ai valori di rapporto < 2. Ciò è attribuibile alla modalità di valutazione qualitativa (vedere sezione 9) e si contrappone ai saggi ELISA valutati quantitativamente per mezzo di una curva standard.



## 11.6 Precisione

Per determinare la precisione del test è stata stabilita la variabilità dei risultati, in presenza delle condizioni seguenti:

- a. entro 1 saggio e fra 3 saggi;
- b. fra 3 operatori;
- c. fra 2 lotti di kit.

### a. Variabilità intra- e inter-saggio (n = rispettivamente 24 e 72)

		variabilità (CV, %)	
campione	rapporto	intra-saggio	inter-saggio
1	1,2	3,0	3,3
2	3,2	2,0	3,0
3	4,9	1,8	4,1

### b. Variabilità fra operatori (n = 12)

campione	rapporto	variabilità (CV, %)
1	1,2	1,7
2	3,2	1,7
3	4,7	1,8

### c. Variabilità fra 2 lotti di kit (n = 6)

campione	rapporto	variabilità (CV, %)
1	1,0	11,9
2	2,9	11,9
3	4,4	9,2

## 11.7 Distribuzione della frequenza di ANA (IgG)

La frequenza è stata analizzata in un pool di sieri da donatori di sangue, distribuiti parimenti in termini di sesso e di età, e un pool di sieri risultati positivi con metodiche indipendenti (per es. saggi ELISA di riferimento a norma CE, monospecifici, saggi di immunofluorescenza (IFA)) per almeno un parametro, o erano clinicamente definiti.

È stata osservata la seguente distribuzione sommaria degli analiti (s = deviazione standard):

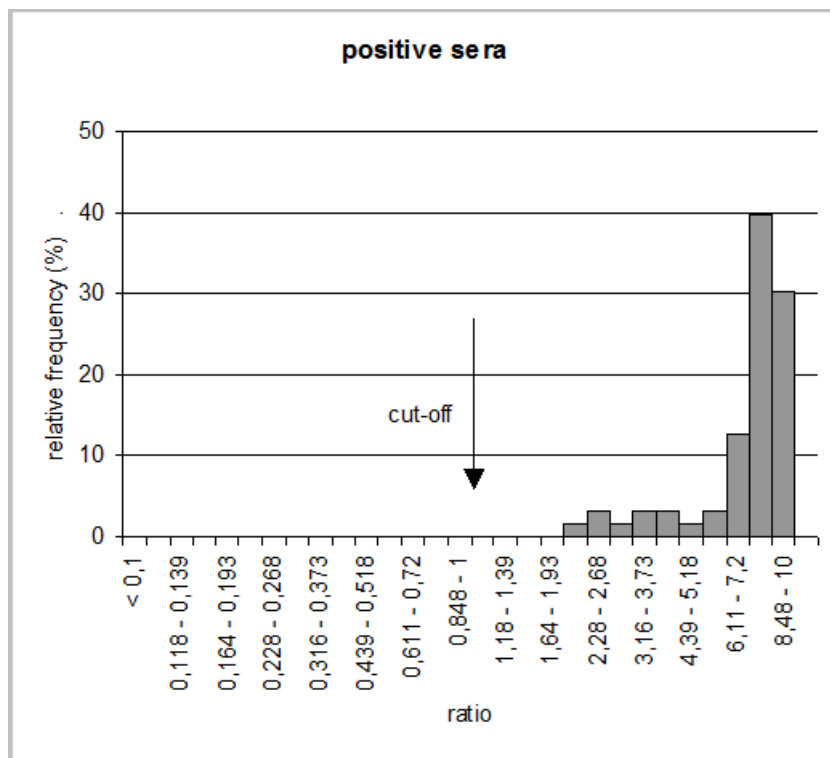
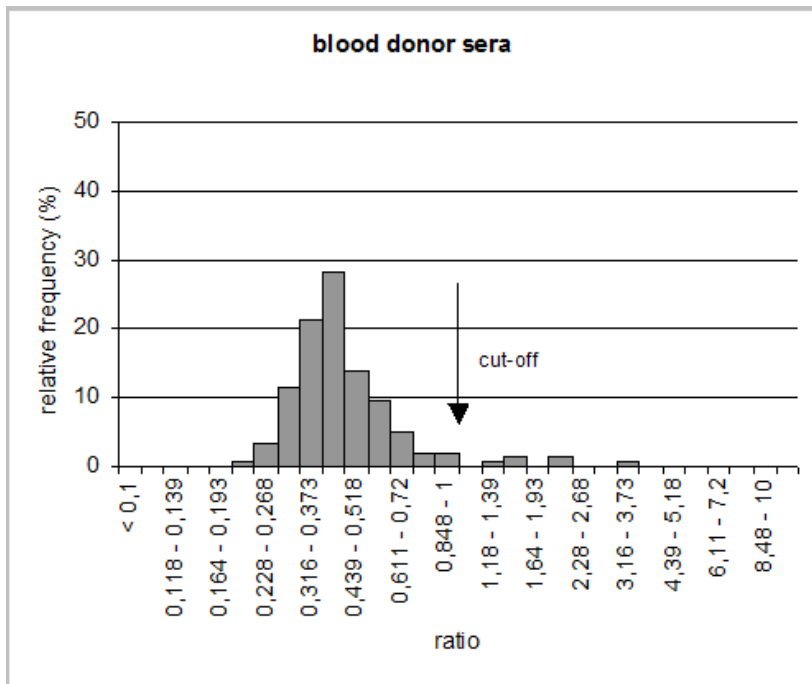
#### sieri da donatori di sangue

n:	160
media:	rapporto = 0,49
media + s:	rapporto = 0,84
media + 2s:	rapporto = 1,19
mediana:	rapporto = 0,40
95° percentile:	rapporto = 0,94

#### sieri positivi

n:	63
media:	rapporto = 7,3
media - s:	rapporto = 5,4
media - 2s:	rapporto = 3,5
mediana:	rapporto = 7,8
5° percentile:	rapporto = 2,9

Ci si è avvalsi dell'analisi ROC di questi dati per determinare il cut-off del saggio ANA Screen 6 ELISA ai sensi di (6). I dati presentati in questa sede suggeriscono una specificità e sensibilità diagnostiche del saggio ELISA rispettivamente di circa 96% e quasi 100%. Detti valori sono validi unicamente per i sieri misurati; altri pool possono generare risultati diversi.



**12 GARANZIA**

DRG garantisce che il prodotto consegnato è stato rigorosamente testato per ottemperare alle proprietà enunciate in questa sede. Non si avanzano garanzie supplementari.

I dati prestazionali qui presentati sono stati ottenuti utilizzando la procedura specificata. Eventuali modifiche di tale procedura possono influire sui risultati e, in tal caso, DRG nega qualsivoglia garanzia, esplicita, implicita o prevista a norma di legge. Inoltre, DRG non accetta alcuna responsabilità per eventuali danni - diretti, indiretti o conseguenti - insorti per via di condizioni improprie nell'uso e nella conservazione del prodotto.

**13 DIAGRAMMA DI FLUSSO RIASSUNTIVO**

- a. Diluire i campioni in rapporto 1/100 nel tampone campione (100 mL, pronto per l'uso, colore arancione), quindi miscelare.
- b. Diluire con il tampone di lavaggio concentrato 10x (100 mL, colore blu) con acqua e miscelare.
- c. Lavare una sola volta ciascuno dei pozzetti con 350  $\mu$ L di tampone di lavaggio.  
Distribuire 100  $\mu$ L dei controlli (3,0 mL ciascuno, pronti per l'uso, colore verde e rosso) e dei campioni diluiti nei pozzetti della fase solida. Si raccomandano misurazioni in duplicato.  
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente ( $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
- c. Lavare 4 volte ciascuno dei pozzetti con 350  $\mu$ L di tampone di lavaggio.
- e. Distribuire nei pozzetti 100  $\mu$ L del coniugato (14 mL, pronto per l'uso, colore rosso).  
Incubare come descritto al punto (c).
- f. Ripetere lo stadio di lavaggio al punto (d).
- e. Distribuire in ogni pozzetto 100  $\mu$ L della soluzione substrato (14 mL, pronta per l'uso, flaconcino nero).  
Incubare come descritto al punto (c).  
In seguito, aggiungere 100  $\mu$ L di soluzione di arresto (14 mL, pronta per l'uso, incolore) in ogni pozzetto e scuotere brevemente la piastra.
- h. Misurare immediatamente l'assorbanza a 450 nm.
- i. Valutazione:  
stabilire l'assorbanza borderline moltiplicando l'assorbanza del controllo positivo per il fattore specificato nel certificato di analisi. In seguito, calcolare il rapporto dei campioni dividendo la loro assorbanza per l'assorbanza borderline.

## 1 INTRODUCCIÓN E INFORMACIÓN PREVIA

Los autoanticuerpos circulantes que combaten varios antígenos intracelulares (anticuerpos antinucleares, ANA) son característicos de enfermedades autoinmunes sistémicas reumáticas del tejido conectivo (1, 2, 3, 4). Estos incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), síndrome de Sjögren (SS) A y B, esclerosis sistémica progresiva (ESP, esclerodermia) y polimiositis (PM).

A menudo es difícil realizar el diagnóstico de las enfermedades anteriores, debido a la superposición de sus síntomas, por lo que, generalmente, se respalda con la medición de sus anticuerpos asociados. Se inmovilizan 6 autoantígenos específicamente reconocidos por estos anticuerpos sobre la fase sólida del presente ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA):

<b>antígeno</b>	<b>fuerce</b>	<b>enfermedad</b>	<b>prevalencia del autoanticuerpo (5)</b>
RNP (proteínas A, C, 68 kDa)	recombinante	EMTC	95 %
		LES	30 - 40 %
		PM	14 %
		SS	4 %
Sm (proteínas B, B', D)	timo bovino	LES	12 - 39 %
		EMTC	7 %
Ro/SS-A (proteína 60 kDa)	timo bovino	SS	60 - 100 %
		LES	45 - 50 %
		EMTC	15 - 30 %
		ESP	5 - 7 %
		PM	5 - 7 %
La/SS-B	recombinante	SS	30 - 90 %
		LES	15 - 30 %
		EMTC	5 - 15 %
Scl-70 (topoisomerasa de ADN tipo I)	recombinante	PSS	20 - 76 %
Jo-1 (histidil-ARNt-sintetasa)	recombinante	PM	20 - 40 %

La prueba está diseñada para la determinación resumen cualitativa de los respectivos autoanticuerpos (IgG) en suero o plasma humano (ver párrafo 7), sin la capacidad de discriminar entre ellos. Está prevista como prueba de pantalla inicial para un diagnóstico general de las enfermedades anteriores. La prueba es rápida (tiempo de incubación 30 / 30 / 30 minutos) y flexible (divisible en fase sólida, reactivos listos para usar). Un control negativo y positivo comprueban el rendimiento del ensayo. El control positivo también sirve como calibrador para la evaluación del ensayo.

## 2 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- El kit de prueba solo está previsto para uso diagnóstico *in vitro*; no para uso interno o externo en seres humanos o animales. Sólo puede ser utilizado por personal capacitado.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad. Se recomienda encarecidamente ceñirse al protocolo.
- El tampón de muestra y los controles contienen azida sódica como conservante. El tampón de lavado contiene bromonitrodioxano y el conjugado metilisotiazolona / bromonitrodioxano como conservantes. El sustrato contiene 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La solución de parada, 0,2 M ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), es ácida y corrosiva.
- Los reactivos mencionados anteriormente pueden ser tóxicos si se ingieren. Seguir las precauciones rutinarias para la manipulación de productos químicos peligrosos. Evitar cualquier contacto con el cuerpo, usar guantes y gafas protectoras. Si uno de los reactivos entra en contacto con la piel o las mucosas, lavar con abundante agua. No pipetear con la boca. Desechar de acuerdo a las regulaciones locales/nacionales.
- La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre y formar azidas metálicas explosivas. Para desechar, lavar con una gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azidas.
- Los controles contienen componentes de origen humano. Han dado resultados negativos en las pruebas de virus de inmunodeficiencia humana (VIH)-Ag, superficie de la hepatitis B (HBs)-Ag, VIH 1/2-Ab y virus de la hepatitis C (VHC)-Ab, en conformidad con las pruebas aprobadas por la FDA o la normativa europea 98/79/EG.
- Sin embargo, no existe ninguna prueba conocida que pueda garantizar que los productos derivados de la sangre humana no sean infecciosos. Por consiguiente, deben ser manipulados como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos y desechados de manera adecuada. Por favor, ponerse en contacto con CDC (Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, EE.UU.) u consultar otras guías locales/nacionales sobre los procedimientos de seguridad y descontaminación del laboratorio.

### 3 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Los pocillos de la fase sólida están revestidos de una mezcla equilibrada de los autoantígenos indicados anteriormente. Sobre esta superficie se llevan a cabo las siguientes reacciones inmunológicas:

- 1ª reacción: Los anticuerpos específicos de los antígenos presentes en la muestra se unen al antígeno inmovilizado y forman el complejo antígeno-anticuerpo. Después, se lavan de la fase sólida los componentes de la muestra que no se han unido.
- 2ª reacción: Se añade un segundo anticuerpo, orientado a los anticuerpos IgG humanos y conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Este conjugado se une al complejo. Después, se lava de la fase sólida el exceso de conjugado.
- 3ª reacción: El complejo etiquetado con una enzima convierte un sustrato incoloro en un producto azul. El grado del color refleja la concentración de anticuerpos específicos de los antígenos (IgG) de la muestra.

### 4 CONTENIDO DEL KIT

- a. **1 placa de micropocillos**, revestida de una mezcla de los antígenos anteriores, herméticamente envasada en una bolsa de papel de aluminio junto con una bolsa desecante. La placa se compone de 12 tiras, cada una de las cuales se puede dividir en 8 pocillos individuales.

MWP	12x8
-----	------

- b. **Tampón de muestra**, 100 mL, listo para usar, color naranja.  
Contiene solución salina tamponada con Tris (TBS), albúmina de suero bovino (ASB), Tween y azida sódica.

BUF	SPL
-----	-----

- c. **Tampón de lavado**, 100 mL, concentrado 10x, color azul.  
Contiene TBS, Tween y bromonitrodioxano.

BUF	WASH	10x
-----	------	-----

- d. **Control negativo y positivo**, 3,0 mL cada uno, listos para usar, color verde y rojo, respectivamente.  
Contiene TBS, ASB, Tween y azida sódica.

CONTROL	-
---------	---

CONTROL	+
---------	---

- e. IgG antihumano **conjugado** con HRP, 14 mL, listo para usar, color rojo.  
La solución tamponada contiene estabilizadores de proteínas, metilisotiazolona y bromonitrodioxano.

CONJ	IgG
------	-----

- f. **Solución de sustrato**, 14 mL, listo para usar, incoloro. Contiene una solución tamponada de TMB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  
Contenida en un vial impermeable a la luz.

SUBS	TMB
------	-----

- g. **Solución de parada** (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 14 mL, incoloro, listo para usar.  
Precaución: el ácido sulfúrico es corrosivo.

SOLN	STOP
------	------

- h. Instrucciones de uso

- i. Certificado del lote específico de análisis

### 5 MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- a. Agua desionizada o destilada
- b. Probeta graduada, 1000 mL
- c. Tubos para la dilución de muestra (tubos de transferencia en el formato recomendado para la placa de micropocillos)
- d. Pipetas de 10, 100 y 1000 µL (se recomiendan pipetas de 1 y 8 canales)
- e. Lavadora de placa de micropocillos (opcional)
- f. Fotómetro de placa de micropocillos equipado con un filtro de 450 nm
- g. Programa de evaluación ELISA (recomendado)

### 6 ALMACENAMIENTO DEL KIT

Almacenar el kit a 2 °C - 8 °C. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja. No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad.



## 7 PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MUESTRAS / REQUISITOS DE LA MUESTRA

No cambiar o juntar los componentes correspondientes a diferentes kits, debido a posibles diferencias en las condiciones de transporte o de almacenamiento.

Si el kit se utiliza en múltiples porciones, sólo los volúmenes requeridos para la prueba actual deben tomarse de los diferentes viales. Es muy importante que no haya contaminación cruzada entre los reactivos! Use sólo pipetas limpias; no devuelva el residuo de reactivo a los frascos originales.

- Antes de abrir la bolsa de la fase sólida, esta debe estar a temperatura ambiente. Retirar los pocillos supernumerarios de la estructura y ponerlos inmediatamente de nuevo en la bolsa, junto con la bolsa desecante. Volver a sellar herméticamente la bolsa y mantenerla refrigerada para un futuro uso.
- Diluir el tampón de lavado concentrado 10x (100 mL, azul) con 900 mL de agua desionizada. Mezclar bien. El tampón diluido es estable durante varias semanas si se mantiene refrigerado (2 °C - 8 °C).

c. Preparación de las muestras:

Manipular las muestras de los pacientes como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos.

**Además del suero, el plasma tratado con EDTA, citrato o heparina también es un material de muestra adecuado.**

Requisitos de la muestra: Muestras altamente lipémicas, hemolizadas o contaminadas por microorganismos pueden dar lugar a resultados erróneos y se deben evitar.

Preparar las muestras mediante las técnicas normales de laboratorio y diluirlos a **1/100**, por ejemplo 10 µL suero / plasma + 990 µL tampón de muestra. Mezclar bien.

Para un rápido depósito durante el procedimiento del ensayo, se recomienda preparar los controles y las muestras en tubos de transferencia para los micropocillos. Esto permite el uso de una pipeta de 8 canales durante el procedimiento del ensayo.

Si las muestras no se analizan inmediatamente, deben almacenarse a 2 °C - 8 °C y analizarse en el plazo de 3 días. Para un almacenamiento largo, se recomienda una temperatura de -20 °C o inferior. Se debe evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras. Las muestras descongeladas deben mezclarse antes de la dilución.

## 8 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

### 8.1 Funcionamiento manual

Antes de empezar el ensayo, todos los componentes del kit deben estar a temperatura ambiente (23 °C ± 3 °C).

Para conseguir los mejores resultados, es decir, el cociente máximo entre la señal específica y la de fondo, es esencial **lavar de manera cuidadosa** (pasos a, c y e). Es de **crucial importancia eliminar completamente la solución de lavado**. A tal fin, golpear la placa firmemente en varias capas de tejido absorbente. Se deben verificar las lavadoras automatizadas de acuerdo a los resultados obtenidos mediante el lavado manual.

- Inmediatamente antes de usar, lavar la fase sólida una vez:  
llenar los pocillos con **350 µL** de tampón de lavado cada uno, remojar durante unos 10 segundos en los pocillos y eliminar.
- Depositar los **controles** y las **muestras diluidas** rápidamente en los pocillos; **100 µL** por pocillo. Se recomienda duplicar las mediciones.

*Incubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (23 °C ± 3 °C).*

- Lavar los pocillos 4 veces como en el paso a.
- Depositar rápidamente (preferiblemente mediante una pipeta de 8 canales) el **conjugado**; **100 µL** por pocillo.

*Incubar la placa como en el paso b.*

- Repetir el paso de lavado c.
- Depositar rápidamente (preferiblemente mediante una pipeta de 8 canales) la **solución de sustrato**; **100 µL** por pocillo.

*Incubar la placa como en el paso b.*

Debido a que el sustrato es fotosensible, evitar la exposición a la luz intensa (por ejemplo, luz solar directa) durante la incubación.

- Depositar rápidamente (preferiblemente mediante una pipeta de 8 canales) la **solución de parada**; **100 µL** por pocillo. Utilizar la misma secuencia que para el sustrato. El color cambia de azul a amarillo. Agitar la placa, preferentemente en un agitador orbital, durante unos 10 segundos.
- Leer inmediatamente la absorbancia en el fotómetro de placa de micropocillos a 450 nm.

Almacenar de manera refrigerada el resto de los reactivos (2 °C - 8 °C) para que puedan ser utilizados de nuevo.

## 9 EVALUACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD

Se evalúa el ensayo de manera cualitativa: se compara la absorbancia de las muestras con el límite de absorbancia (= absorbancia límite). La absorbancia límite se determina por medio del control positivo que al mismo tiempo funciona como calibrador, de acuerdo con la fórmula:

$$\text{absorbancia límite} = \text{absorbancia del control positivo} \times \text{factor}$$

El factor depende del lote del kit y viene indicado en el certificado del lote específico de análisis (incluido con cada kit de prueba).

Ejemplo:

$$\begin{aligned} \text{absorbancia del control positivo} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{factor} &= 0,35 \\ \text{absorbancia límite} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

Con el fin de hacerse una idea del grado de reactividad de una muestra, se calcula el cociente entre la muestra y el límite de absorbancia como:

$$\text{Cociente} = \text{absorbancia de la muestra} / \text{absorbancia límite}$$

Ejemplo:

$$\begin{aligned} \text{absorbancia límite} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{absorbancia de la muestra} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{cociente} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

### Control de calidad:

El control positivo (calibrador) y negativo comprueban el rendimiento del ensayo. Sus intervalos aceptables vienen indicados en el certificado del lote específico de análisis. Los valores de los controles deben estar dentro de los intervalos indicados; de lo contrario, los resultados del ensayo quedan invalidados.

## 10 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS / LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Sobre la base de la medición de un donante de sangre y un conjunto positivo de sueros (véase más adelante), para la evaluación de los sueros de los pacientes se sugiere:

	<b>Cociente</b>
intervalo normal (negativo)	< 0,82
límite	1,00
intervalo equívoco	0,82 - 1,20
intervalo positivo	> 1,20

Estas especificaciones son a título indicativo; con el fin de comprobar su exactitud, cada análisis debe incluir muestras paralelas de sueros normales.

Un **resultado negativo de la prueba** indica que el paciente probablemente no tiene un nivel elevado de anticuerpos IgG contra los antígenos mencionados al principio. Por lo tanto, es bastante improbable la presencia de una enfermedad reumática sistémica pero, sin embargo, no se puede descartar.

Un **resultado positivo** debería considerarse como una indicación de una de las enfermedades mencionadas anteriormente. Como diagnóstico de seguimiento, se deben determinar la especificidad del autoanticuerpo causante y, por lo tanto, la enfermedad autoinmune. Se puede lograr mediante un perfil diferenciador de ELISA.

Las muestras que proporcionan resultados entre los límites indicados anteriormente se deberían considerar como **equivocos** e informar de ellos como tales. Se recomienda recoger una segunda muestra dos semanas después y realizar la prueba en paralelo a la primera muestra para documentar un posible cambio de título de los anticuerpos.

Como con cualquier prueba serológica, se deben interpretar los resultados a la luz de los síntomas del paciente y otros criterios de diagnóstico.

## 11 CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

### 11.1 Estandarización

La prueba ha sido estandarizada con una preparación de suero purificado que contiene anticuerpos IgG orientados a cada uno de los autoantígenos inmovilizados. Constituye el material de *stock* para los dos controles de la prueba. La proporción de los anticuerpos se ha ajustado de tal manera que cada una contribuye aproximadamente con la misma fracción a la señal general.

La preparación del *stock* se ha calibrado contra un conjunto de sueros monoespecíficamente positivos reservado exclusivamente a tal efecto. El grado de reactividad de la muestra se expresa vía el cociente resumen, tal como se describe arriba.

### 11.2 Especificidad analítica

La prueba permite la determinación específica de los anticuerpos IgG humanos, orientados a los autoantígenos indicados en el artículo 1. Ha sido validada (entre otros criterios) usando sueros humanos de referencia del Centro de Control de Enfermedades (CDC; Atlanta, EE.UU.), los cuales están disponibles a nivel comercial. Son típicos los siguientes resultados (valores cociente):

Suero	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
resultado CDC	ADNdc	La/SS-B	--	U1-RNP	Sm	--	Ro/SS-A	--	Scl-70	Jo-1
Inmunofluoresc.	homogénea	con manchas	con manchas	--	--	nucleolar	--	centrómero	--	--
cociente	2,1	8,7	7,6	3,3	8,4	1,0	6,2	0,3	6,6	8,2

*Observación:* El correspondiente ANA Profile 8 ELISA que diferencia entre antígenos reveló: El suero núm. 2 reacciona no solo con ADNdc sino también con Sm. El suero núm. 6 muestra valores del cociente  $\leq 1$  hacia todos los antígenos individuales. El suero núm. 8 reacciona fuertemente con la proteína B del centrómero que no está incluida en el rango de antígenos de ANA Screen 6 ELISA.

### 11.3 Límite de detección (sensibilidad analítica)

El límite de detección se define como la concentración de análito que corresponde a la absorbancia media del tampón de muestra más 3 veces la desviación estándar (s). Se determinó como  $< 0,4$  (cociente;  $n = 24$ ).

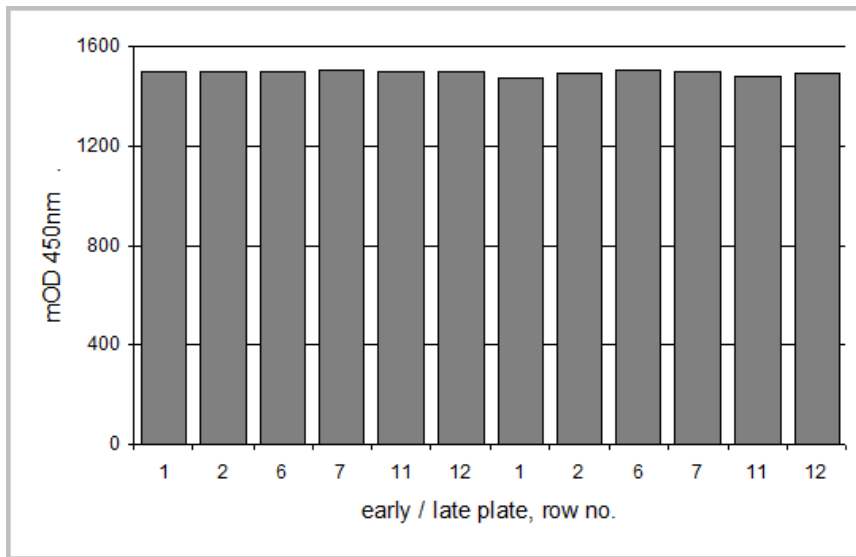
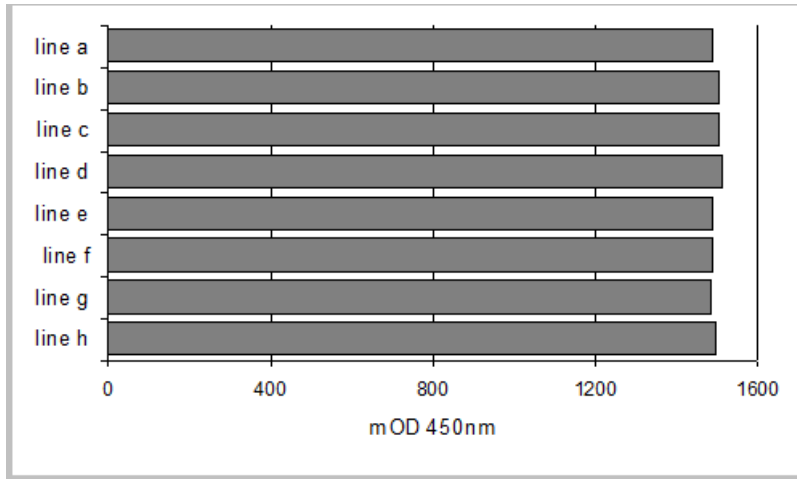
Intervalo de medida recomendado:  $0,5 < \text{cociente} < 6$

### 11.4 Homogeneidad de fase sólida

La medición de la homogeneidad de fase sólida es una parte habitual del control de calidad de cada lote de producción. Se determina midiendo 288 veces una muestra positiva de IgG pero no saturada, en 3 placas seleccionadas.

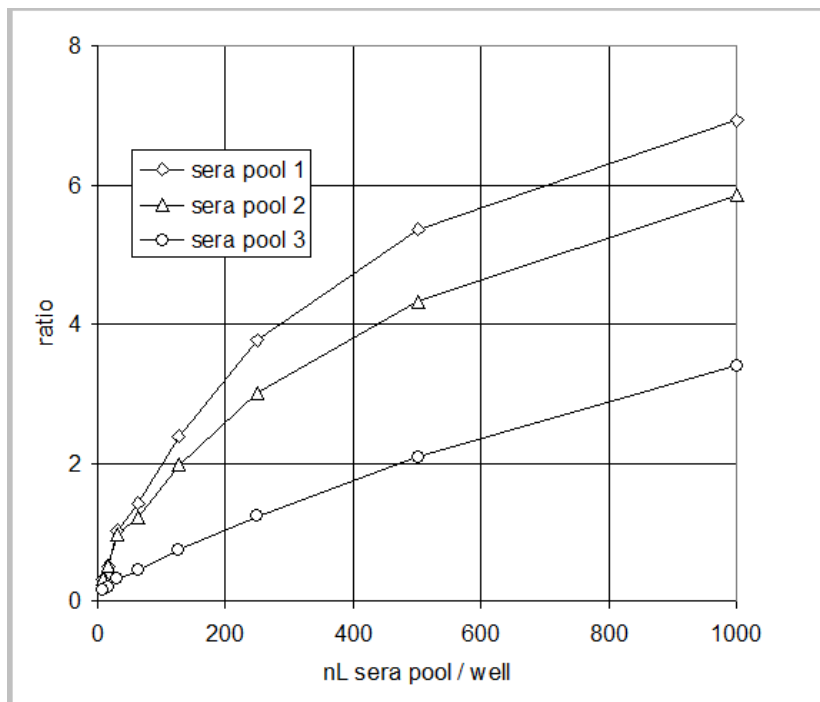
Criterio de aceptación: coeficiente mOD de variación (CV) en las placas  $< 8\%$ . La siguiente figura muestra un extracto representativo (fase sólida lote núm. 2308I) de este análisis.

placa	temprano (n/10)						tardío (9n/10)						media CV%	
	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11	12		
línea a	1464	1480	1490	1527	1476	1475	1490	1492	1495	1461	1478	1525	1488	1,4
línea b	1514	1522	1528	1511	1487	1489	1472	1480	1504	1534	1484	1519	1504	1,4
línea c	1488	1520	1518	1531	1524	1509	1464	1503	1529	1506	1463	1484	1503	1,6
línea d	1517	1500	1518	1524	1533	1529	1497	1508	1528	1522	1461	1491	1511	1,4
línea e	1504	1492	1499	1472	1473	1503	1471	1483	1498	1501	1497	1457	1488	1,1
línea f	1480	1482	1468	1505	1478	1498	1438	1502	1503	1488	1510	1515	1489	1,4
línea g	1493	1465	1478	1493	1512	1507	1457	1460	1481	1483	1475	1500	1484	1,2
línea h	1545	1516	1504	1519	1517	1496	1466	1487	1504	1497	1468	1457	1498	1,7
media	1501	1497	1500	1510	1500	1501	1469	1489	1505	1499	1480	1494	<b>1495</b>	
CV%	1,7	1,4	1,4	1,3	1,6	1,1	1,3	1,0	1,1	1,5	1,1	1,8		<b>1,5</b>



**11.5 Relación dosis-efecto**

Para evaluar esta característica de ELISA, se midieron grupos de sueros individuales con reactividad heterogénea en series de diluciones al 1/2. A continuación se muestra un resultado típico. Una relación aproximadamente lineal entre la concentración de la muestra y el cociente resultante se limita a valores del cociente < 2. Esto es debido a la manera cualitativa de evaluar (cf. artículo 9) y los contrastes de ELISA que se evalúan cuantitativamente por medio de una curva estándar.



## 11.6 Precisión

Para la evaluación de la precisión de la prueba, se determinó la variabilidad de los resultados en las siguientes condiciones:

- dentro de 1 ensayo y entre 3 ensayos;
- entre 3 operadores; y
- entre 2 lotes del kit.

### a. Variabilidad intra- e interensayo (n = 24 y 72, respectivamente)

muestra	cociente	variabilidad (CV, %)	
		intraensayo	interensayo
1	1,2	3,0	3,3
2	3,2	2,0	3,0
3	4,9	1,8	4,1

### b. Variabilidad entre operadores (n = 12)

muestra	cociente	variabilidad (CV, %)
1	1,2	1,7
2	3,2	1,7
3	4,7	1,8

### c. Variabilidad entre 2 lotes del kit (n = 6)

muestra	cociente	variabilidad (CV, %)
1	1,0	11,9
2	2,9	11,9
3	4,4	9,2

## 11.7 Distribución de frecuencia de ANA (IgG)

Se analizó en un conjunto de sueros de donantes de sangre, distribuidos de manera equitativa según sexo y edad, y un conjunto de sueros que habían dado positivo mediante métodos independientes para al menos un parámetro (por ejemplo, ensayos de inmunofluorescencia (IFA) monoespecíficos y de referencia para ELISA de acuerdo con la CE) o habían sido clínicamente definidos.

Se observó la siguiente distribución resumen de análisis (s = desviación estándar):

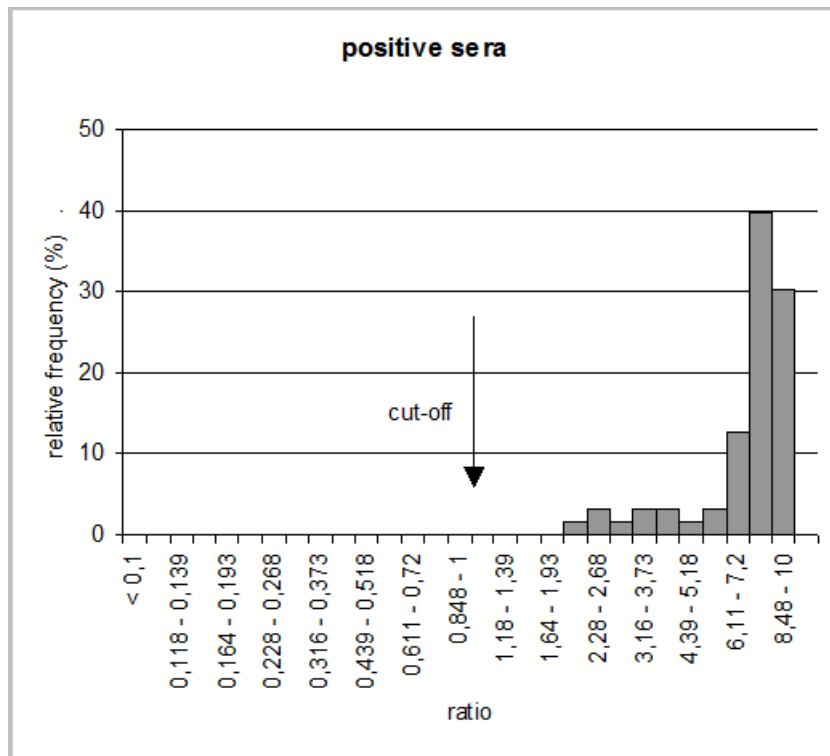
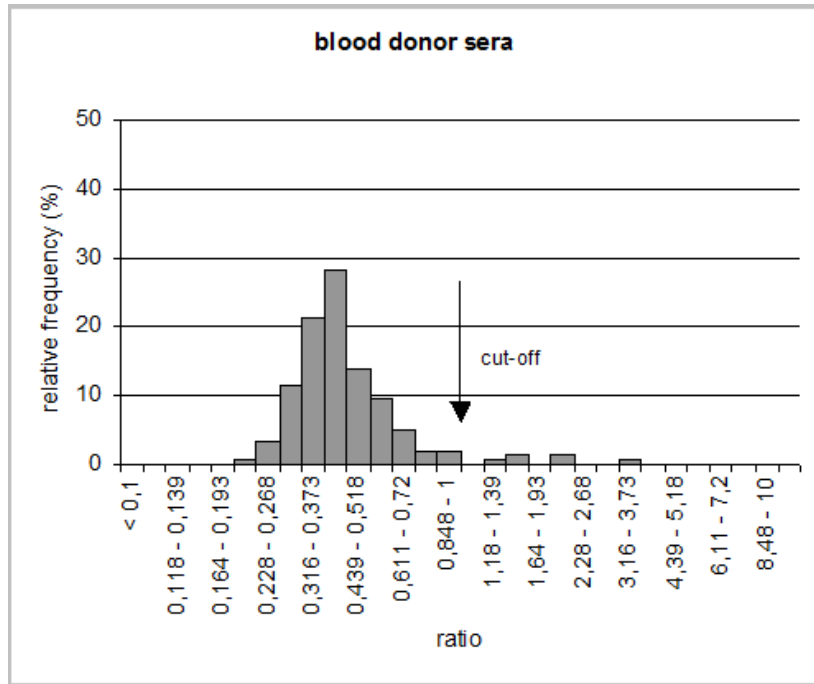
#### sueros de donantes de sangre

n:	160
media:	cociente = 0,49
media + s:	cociente = 0,84
media + 2s:	cociente = 1,19
mediana:	cociente = 0,40
percentil 95:	cociente = 0,94

#### sueros positivos

n:	63
media:	cociente = 7,3
media - s:	ratio = 5,4
media - 2s:	ratio = 3,5
mediana:	cociente = 7,8
percentil 5:	cociente = 2,9

Se utilizó el análisis ROC de estos datos para determinar el límite de ANA Screen 6 ELISA de acuerdo con (6). Los datos presentados sugieren una especificidad y sensibilidad del diagnóstico de ELISA de aproximadamente el 96 % y casi el 100 %, respectivamente. Estos valores son válidos solo para los sueros medidos; otros colectivos pueden dar resultados diferentes.



## 12 GARANTÍA

DRG garantiza que el producto entregado ha sido probado a fondo para asegurar que se cumplen las propiedades especificadas en este documento. No se proporciona ninguna garantía adicional.

Los datos del rendimiento presentados se obtuvieron mediante el procedimiento indicado. Cualquier modificación en el procedimiento puede afectar a los resultados, en cuyo caso DGR se exime de toda garantía, ya sea expresa, implícita o por ley. Además, DGR no asume ninguna responsabilidad por cualquier daño, ya sea directo, indirecto o consecuente, que resulte del uso o almacenamiento inadecuado del producto.

**13 CUADRO RESUMEN**

- a. Diluir el muestra 1/100 en el tampón de muestra (100 mL, listo para usar, naranja) y mezclar.
- b. Diluir el tampón de lavado concentrado 10x (100 mL, azul) con agua y mezclar.
- c. Limpiar los pocillos una vez con 350 µL de tampón de lavado cada uno.  
Depositar 100 µL de los controles (3,0 mL cada uno, listos para usar, verde y rojo) y de las muestras diluidas en los pocillos de la fase sólida. Se recomienda duplicar las mediciones.  
Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente ( $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
- d. Limpiar los pocillos 4 veces con 350 µL de tampón de lavado cada uno.
- e. Depositar 100 µL del conjugado (14 mL, listo para usar, rojo) en los pocillos.  
Incubar como en el paso c.
- f. Repetir el paso de lavado d.
- g. Depositar 100 µL de la solución de sustrato (14 mL, lista para usar, vial negro) en cada pocillo.  
Incubar como en el paso c.  
Después, añadir 100 µL de solución de parada (14 mL, lista para usar, incolora) en cada pocillo y agitar brevemente la placa.
- h. Medir inmediatamente la absorbancia a 450 nm.
- i. Evaluación:  
Determinar el límite de absorbancia multiplicando la absorbancia del control positivo por el factor indicado en el certificado de análisis. Después, calcular el cociente de las muestras dividiendo su absorbancia entre el límite de absorbancia.

## 1 INTRODUCTION ET CONTEXTE

Les anticorps circulants dirigés contre différents antigènes intracellulaires (anticorps antinucléaires, ANA *antinuclear antibodies*) sont caractéristiques de maladies rhumatologiques systémiques à médiation autoimmune touchant le tissu conjonctif (1, 2, 3, 4). On compte parmi ces maladies on compte le lupus érythémateux disséminé (SLE - *Systemic Lupus Erythematosus*), la connectivite mixte de Sharp (MCTD - *Mixed Connective Tissue Disease*), le syndrome de Sjögren (SS - *Sjögren's Syndrome*) A et B, la sclérodémie systémique (PSS - *Progressive Systemic Sclerosis*) et la polymyosite (PM - *Polymyositis*)

Le diagnostic des troubles mentionnés ci-dessus est souvent difficile, à cause des symptômes communs, c'est pourquoi on étaye les diagnostics en mesure les anticorps associés à ces troubles. Six types d'autoantigènes qui sont reconnus spécifiquement par ces anticorps sont immobilisés sur la phase solide du présent test de dosage d'immunoabsorption par enzyme (ELISA) :

antigène	source	maladie	prévalence de l'anticorps (5)
RNP (protéines A, C, 68 kDa)	recombinant	MCTD	95 %
		SLE	30 - 40 %
		PM	14 %
		SS	4 %
Sm (protéines B, B', D)	thymus de bovin	SLE	12 - 39 %
		MCTD	7 %
SS-A/Ro (protéine de 60 kDa)	thymus de bovin	SS	60 - 100 %
		SLE	45 - 50 %
		MCTD	15 - 30 %
		PSS	5 - 7 %
		PM	5 - 7 %
SS-B/La	recombinant	SS	30 - 90 %
		SLE	15 - 30 %
		MCTD	5 - 15 %
Sci-70 (ADN topoisomérase 1)	recombinant	PSS	20 - 76 %
Jo-1 (histidyl-ARNt synthétase)	recombinant	PM	20 - 40 %

Le test est conçu pour la détermination qualitative récapitulative des anticorps respectifs (IgG) dans le sérum ou le plasma humain (cf. section 7), sans la possibilité des les différencier. Il a pour vocation d'être un test de dépistage initial pour un diagnostic global de troubles ci-dessus. Le test est rapide (temps d'incubation : 30 / 30 / 30 minutes) et flexible (phase solide divisible, réactifs prêts à l'emploi). Un contrôle positif et un contrôle négatif vérifient la performance du test. Le contrôle positif sert également de calibrateur pour l'évaluation de l'essai.

## 2 AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

- Le kit de test est prévu uniquement pour le diagnostic in vitro, il n'est pas pour l'usage interne chez les humains ou les animaux. Il doit être exécuté par du personnel qualifié.
- Ne pas utiliser les réactifs après leur date d'expiration. Il est fortement recommandé de suivre le protocole.
- Le tampon d'échantillon et les contrôles contiennent de l'azoture de sodium qui a un rôle de conservateur. Le tampon de lavage contient du bromonitrodioxane et du méthylisothiazolone / bromonitrodioxane conjugués qui ont un rôle de conservateur. Le substrat contient du 3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La solution d'arrêt, de l'acide sulfurique à 0,2 M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), est acide et corrosive.
- Les réactifs mentionnés ci-dessus peuvent être toxiques en cas d'ingestion. Veuillez suivre les précautions habituelles de manipulation des substances chimiques dangereuses. Éviter tout contact avec le corps, porter des gants et des protections oculaires. Si un des réactifs entre en contact avec la peau ou une muqueuse, rincer abondamment à l'eau. Ne jamais pipeter à la bouche Mettre au rebut conformément aux réglementations locales/nationales.
- L'azoture de sodium peut réagir avec les canalisations en plomb ou en cuivre et former des azotures métalliques explosifs. Lors de la mise au rebut, veuillez rincer abondamment avec une grande quantité d'eau afin d'éviter la formation d'azotures.
- Les contrôles contiennent des composants d'origine humaine. Ils ont donné des résultats négatifs lors du dépistage d'antigènes du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [(HIV-Ag)], d'antigènes de surface de l'hépatite B [(HBs)-Ag], d'anticorps du virus de l'immunodéficience humaine [HIV 1/2-Ab] et d'anticorps du virus de l'hépatite C [(HCV)-Ab], à l'aide de tests agréés par la FDA ou conformes à la directive européenne 98/79/CE.
- Cependant, aucun test connu ne peut garantir que les produits issus du sang humain ne sera pas infectieux. Ils doivent donc être manipulés en considérant qu'ils peuvent transmettre des agents infectieux, et ils doivent être mis au rebut de manière adéquate. Veuillez vous référer aux instructions sur la sécurité au laboratoire et sur les procédures de décontamination établies par le CDC (centre de contrôle des maladies), Atlanta, É-U) ou par d'autres autorités locales/nationales.



### 3 PRINCIPE DU TEST

Les puits de la phase solide sont recouverts des autoantigènes mentionnés ci-dessus en mélange équilibré. À la surface, les réactions immunologiques suivantes se produisent :

- 1<sup>ère</sup> réaction : Les anticorps spécifiques des antigènes présents dans l'échantillon se fixent sur l'antigène immobilisé, formant ainsi le complexe antigène-anticorps. Ensuite, les composants non liés de l'échantillon sont éliminés de la phase solide par lavage.
- 2<sup>e</sup> réaction : Un second anticorps, dirigé contre les anticorps IgG humains et conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie au complexe. Ensuite, le conjugué en excès est éliminé de la phase solide par lavage.
- 3<sup>e</sup> réaction : Le complexe marqué par enzyme convertit un substrat incolore en un produit de couleur bleue. Le degré de développement de la couleur traduit la concentration en anticorps spécifiques des antigènes (IgG) dans l'échantillon.

### 4 CONTENU DU KIT

- a. **1 Plaque à micropuits**, dont les puits sont recouverts d'un mélange des antigènes ci-dessus, conditionnés hermétiquement dans un sachet en aluminium contenant un sachet déshydratant. La plaque est constituée de 12 bandes, qui contiennent chacune 8 puits individuels.

MWP	12x8
-----	------

- b. **Tampon d'échantillon**, 100 mL, prêt à l'emploi, de couleur orange. Il contient du Tris salin (TBS), de l'albumine sérique bovine (BSA), du Tween et de l'azotate de sodium.

BUF	SPL
-----	-----

- c. **Tampon de lavage**, 100 mL, concentré 10X, de couleur bleue. Contient du TBS, du Tween et du bromonitrodioxane.

BUF	WASH	10x
-----	------	-----

- d. **Contrôle négatif et positif**, 3,0 mL chacun, prêts à l'emploi, de couleur verte et rouge, respectivement. Contient du TBS, du BSA, du Tween et de l'azotate de sodium.

CONTROL	-	CONTROL	+
---------	---	---------	---

- e. **Conjugué**, IgG anti-humaine HRP, prêt à l'emploi, de couleur rouge. Solution tamponnée contenant des protéines de stabilisation, du bromonitrodioxane et du bromonitrodioxane.

CONJ	IgG
------	-----

- f. **Solution de substrat**, 14 mL, prête à l'emploi, incolore. Contient une solution tamponnée de TMB et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Conservé dans un flacon opaque à la lumière.

SUBS	TMB
------	-----

- g. **Solution d'arrêt** (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 M), 14 mL, incolore, prête à l'emploi. Attention : l'acide sulfurique est corrosif.

SOLN	STOP
------	------

- h. Mode opératoire
- i. Certificat d'analyse spécifique au lot

### 5 MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- a. Eau déminéralisée ou distillée
- b. Éprouvette graduée, 1000 mL
- c. Tubes pour la dilution des échantillons (il est recommandé d'utiliser des tubes de transfert au format de la plaque à micropuits)
- d. Pipettes pour 10, 100 et 1000 µL (pipette monocanal ou à 8 canaux recommandée)
- e. Laveur de plaques à micropuits (optionnel)
- f. Photomètre de plaques à micropuits équipé d'un filtre à 450 nm
- g. Programme d'évaluation ELISA (recommandé)

### 6 CONSERVATION DU KIT

Conserver à 2 °C - 8 °C. Il est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de la boîte. Ne pas utiliser le kit après sa date d'expiration.

## 7 PREPARATION DES REACTIFS ET DE L'ECHANTILLON / ECHANTILLONS REQUIS

Ne pas échanger ou mélanger des composants de différents kits, à cause de la possibilité de conditions différentes de transport et de stockage.

Si le kit est utilisé en plusieurs portions, seuls les volumes requis pour le test en cours doivent être prélevés dans les différentes fioles. Il est très important qu'il n'y ait pas de contamination croisée entre les réactifs ! N'utilisez que des pipettes propres; ne remettez pas les résidus de réactifs dans les flacons d'origine.

- La phase solide doit être portée à température ambiante avant d'ouvrir son sachet. Retirer les micropuits surnuméraires du cadre et les remettre immédiatement dans le sachet, avec sachet déshydratant. Refermer hermétiquement le sachet et le mettre au réfrigérateur jusqu'aux utilisations suivantes.
- Diluer le tampon de lavage concentré 10X (100 mL, bleu) dans 900 mL d'eau déminéralisée. Bien mélanger. Le tampon dilué est stable pendant plusieurs semaines s'il est conservé au réfrigérateur (2 °C - 8 °C).
- Préparation des échantillons : Manipuler les échantillons des patients en considérant qu'ils peuvent transmettre des agents infectieux. **Outre le sérum, le plasma traité à l'EDTA, au citrate ou à l'héparine convient également comme échantillon.**

Échantillons requis : Les échantillons très lipémiques, hémolysés ou présentant une contamination bactérienne peuvent engendrer des résultats erronés et doivent être évités.

Préparer les échantillons en utilisant les techniques de laboratoire habituelles et les diluer au **1/100**, c.-à-d. 10 µL de sérum ou plasma + 990 µL de tampon d'échantillon. Bien mélanger.

Pour une distribution rapide au cours de la procédure de test, il est recommandé de préparer les contrôles et les échantillons dans des tubes de transfert pour micropuits. Cela permet l'utilisation d'une pipette à 8 canaux lors de la procédure de test.

Si les échantillons ne sont pas testés immédiatement, ils doivent être conservés à 2 °C - 8 °C et analysés dans les 3 jours. Pour un stockage plus long, une température de -20 °C ou inférieure est recommandée. Les cycles répétés de congélation / décongélation des échantillons doivent être évités. Les échantillons décongelés doivent être agités avant la dilution.

## 8 PROCEDURE DU TEST

### 8.1 Utilisation manuelle

Avant de commencer le test, tous les composants du kit doivent être à température ambiante (23 °C ± 3 °C).

Pour obtenir des résultats optimisés, c.-à-d. avec un rapport signal spécifique/signal de fond maximal, il est essentiel d'effectuer des **lavages minutieux** (étapes a, c et e). Il est **crucial d'éliminer complètement la solution de lavage**. Pour cela, il faut tapoter fermement la plaque sur plusieurs couches de papier absorbant. Les laveurs automatiques doivent être vérifiés en fonction des résultats obtenus par lavage manuel.

- Immédiatement avant utilisation, laver la phase solide une fois : remplir chaque puits avec **350 µL de tampon de lavage**, laisser tremper 10 secondes le tampon de lavage dans les puits puis le retirer.
- Distribuer rapidement dans les micropuits **les contrôles et les échantillons dilués** ; **100 µL** par puits. Il est recommandé d'effectuer des mesures en double.  
*Incuber la plaque pendant 30 minutes à température ambiante (23 °C ± 3 °C).*
- Laver les puits 4 fois selon la procédure de l'étape a.
- Dispenser rapidement (de préférence en utilisant une pipette à 8 canaux) **le conjugué**; **100 µL** par puits.  
*Incuber la plaque selon la procédure de l'étape b.*
- Renouveler l'étape de lavage c.
- Dispenser rapidement (de préférence en utilisant une pipette à 8 canaux) **la solution de substrat**; **100 µL** par puits.  
*Incuber la plaque selon la procédure de l'étape b.*  
Étant donné que le substrat est photosensible, éviter l'exposition intense à la lumière (p. ex. lumière directe du soleil) au cours de l'incubation.
- Dispenser rapidement (de préférence en utilisant une pipette à 8 canaux) **la solution d'arrêt**; **100 µL** par puits. Utiliser la même séquence opératoire que pour le substrat. La couleur passe du bleu au jaune. Agiter la plaque, de préférence sur un agitateur orbital, pendant environ 10 secondes.
- Lire immédiatement l'absorbance à l'aide du photomètre pour plaques à micropuits à 450 nm.

Conserver les réactifs restants au réfrigérateur (2 °C - 8 °C) s'ils doivent être utilisés à nouveau.

## 9 ÉVALUATION ET CONTROLE QUALITE

Le test est évalué de manière qualitative : l'absorbance des échantillons est comparée à l'absorbance limite (absorbance seuil). L'absorbance seuil est déterminée au moyen du contrôle positif qui tient en même temps le rôle de calibrateur, selon la formule suivante :

$$\text{absorbance limite} = \text{absorbance du contrôle positif} \times \text{facteur}$$

Le facteur est fonction du lot du kit est figure sur le certificat d'analyse spécifique au lot (inclus dans chaque kit de test).

Exemple :

$$\begin{aligned} \text{absorbance du contrôle positif} &= 1250 \text{ mDO} \\ \text{facteur} &= 0,35 \\ \text{absorbance limite} &= 1250 \text{ mDO} \times 0,35 = 438 \text{ mDO} \end{aligned}$$

Afin d'avoir un aperçu du degré de réactivité de l'échantillon, on calcule le rapport entre l'absorbance de l'échantillon et l'absorbance limite :

$$\text{Rapport} = \text{absorbance de l'échantillon} / \text{absorbance limite}$$

Exemple :

$$\begin{aligned} \text{absorbance limite} &= 438 \text{ mDO} \\ \text{absorbance de l'échantillon} &= 1480 \text{ mDO} \\ \text{rapport} &= 1480 \text{ mDO} / 438 \text{ mDO} = 3,4 \end{aligned}$$

### Contrôle qualité :

Le contrôle positif (calibrateur) et le contrôle négatif permettent de vérifier la performance du test. Leur plage de valeurs acceptables sont indiquées sur le certificat d'analyse spécifique au lot. Les valeurs des contrôles doivent se situer à l'intérieur des plages indiquées, dans le cas contraire, les résultats du test sont invalidés.

## 10 INTERPRETATION DES RESULTATS / LIMITES DE LA PROCEDURE

En se basant sur les mesures obtenues avec un donneur de sang et avec en ensemble de sérums positifs (voir ci-dessous), nous proposons les valeurs suivantes pour l'évaluation du sérum des patients :

	<u>Rapport</u>
plage normale (test négatif)	< 0,82
seuil	1,00
plage équivoque	0,82 - 1,20
plage positive	> 1.20

Ces spécifications sont données à titre indicatif uniquement ; afin d'en vérifier la justesse, chaque analyse doit comporter en parallèle des échantillons de sérums normaux.

Un **résultat de test négatif** indique que le patient n'a probablement pas un taux augmenté d'anticorps IgG dirigés contre les antigènes listés au début du présent document. Ainsi, la présence d'une maladie rhumatologique systémique est très peu probable, mais ne peut pas être exclue.

Un **résultat positif** doit être considéré comme indicatif de l'une des maladies listées plus haut. Afin de poursuivre l'évaluation diagnostique, il faut déterminer la spécificité de l'anticorps en cause et identifier ainsi le trouble autoimmun. Ceci peut être effectué à l'aide d'un test ELISA de différenciation de profils.

Les échantillons dont les résultats se situent entre les plages limites indiquées ci-dessus doivent être considérés comme **équivoques**, ce qui doit être indiqué dans les rendus de résultats. Il est recommandé de recueillir un second échantillon à deux semaines d'intervalle et de l'analyser parallèlement au premier échantillon afin de documenter une éventuelle modification du dosage des anticorps.

Comme pour tout test sérologique, les résultats doivent être interprétés en tenant compte des symptômes du patient et d'autres critères de diagnostic.

## 11 CARACTERISTIQUES DE LA PERFORMANCE

### 11.1 Standardisation

Le test est standardisé à l'aide d'une préparation sérique purifiée contenant les anticorps IgG dirigés contre chacun des autoantigènes immobilisés. Elle constitue le matériel de réserve pour les deux contrôles du test. La proportion d'anticorps est ajustée de telle sorte que chacun contribue approximativement dans les mêmes proportions du signal total.

La préparation de réserve est calibrée avec une série de sérums monospécifiques positifs réservés à cet usage. Le degré de réactivité des échantillons est exprimé sous forme de rapport synthétique, tel que décrit plus haut.

### 11.2 Spécificité analytique

Ce test permet la détermination spécifique d'anticorps IgG humains dirigés vers les autoantigènes listés au point 1. Il a été validé (parmi d'autres critères) en utilisant des sérums humains de référence du Center for Disease Control (CDC, Atlanta, É-U) disponibles commercialement. Voici les résultats typiquement obtenus (valeurs du rapport) :

Sérum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Résultats du CDC	ADNdb	SS-B/La	--	U1-RNP	Sm	--	SS-A/Ro	--	Scl-70	Jo-1
Immunfluoresc. rapport	homogène	granulation	granulation	--	--	nucléolaire	--	centromère	--	--
	2,1	8,7	7,6	3,3	8,4	1,0	6,2	0,3	6,6	8,2

*Remarque* : Le test correspondant ANA Profile 8 ELISA qui discrimine les différents antigènes a donné les résultats suivants : Le sérum n° a réagi pas uniquement avec l'ADNdb, mais aussi avec l'antigène Sm. Les valeurs de rapport obtenues pour le sérum n° 6 étaient  $\leq 1$  pour tous les antigènes. Le sérum n° 8 a fortement réagi avec la protéine B du centromère qui ne fait pas partie de la gamme d'antigènes testés dans le présent test ANA Screen 6 ELISA.

### 11.3 Limite de détection (sensibilité analytique)

La limite de détection se définit comme la concentration en analytes qui correspond à l'absorbance moyenne du tampon d'échantillon plus trois fois l'écart-type (ET). Elle a été déterminée comme étant  $< 0,4$  (rapport ; n = 24).

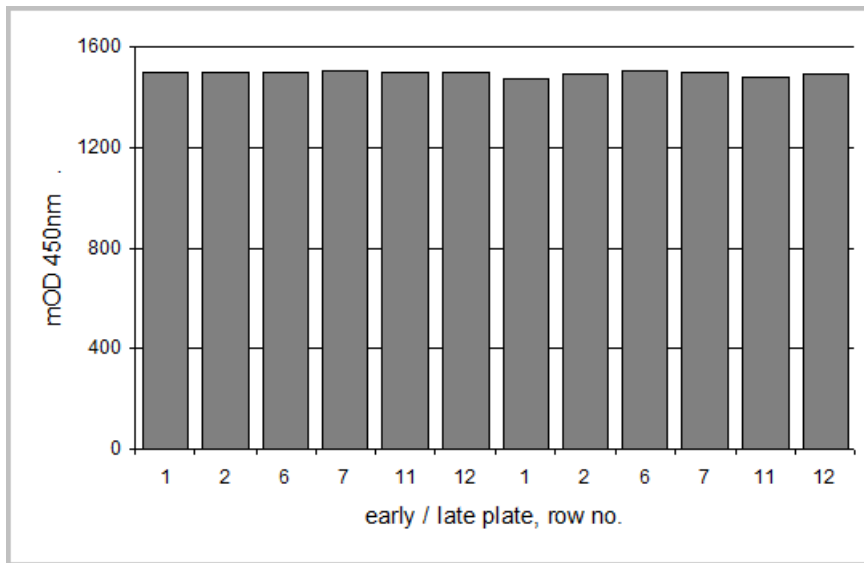
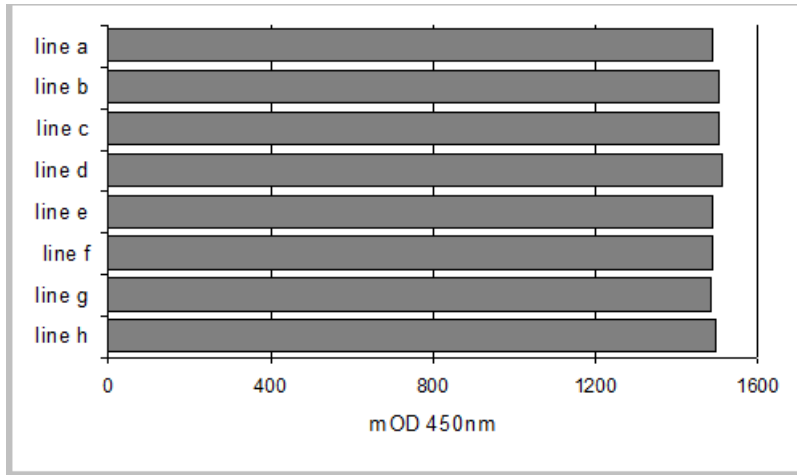
Plage de mesure recommandée :  $0,5 < \text{rapport} < 6$

### 11.4 Homogénéité de la phase solide

La mesure de l'homogénéité de la phase solide fait partie du CQ régulier effectué pour chaque lot de production. Elle est déterminée par 288 mesures successives d'un échantillon positif aux IgG sans être saturé sur 3 plaques différentes.

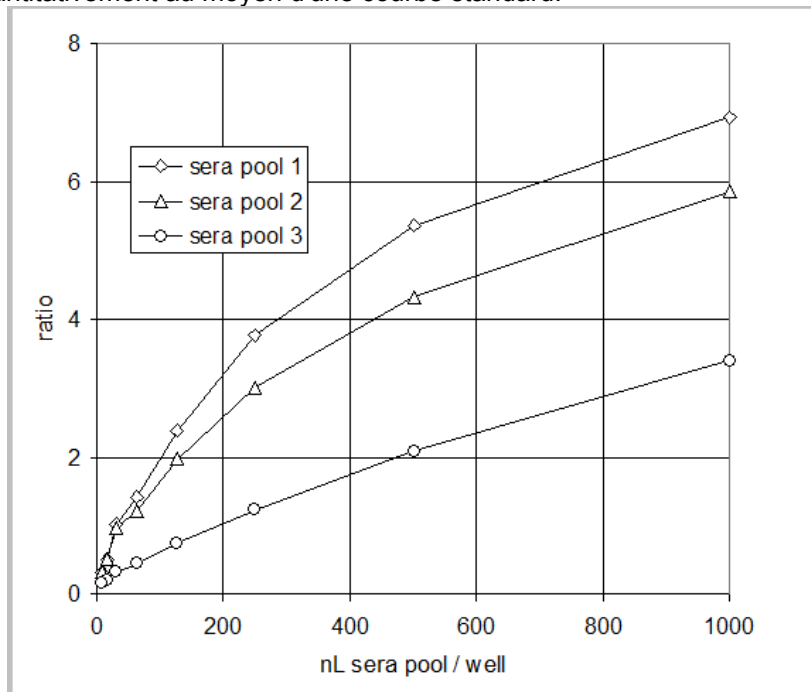
Critère d'acceptation : coefficient de variation (CV) de la mDO entre les plaques  $< 8\%$ . L'illustration ci-dessous présente un extrait représentatif (lot de la phase solide n° 23081) d'une telle analyse.

plaque rangée	précoce (n/10)						tardif (9n/10)						moyenne	CV %
	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11	12		
ligne a	1464	1480	1490	1527	1476	1475	1490	1492	1495	1461	1478	1525	1488	1,4
ligne b	1514	1522	1528	1511	1487	1489	1472	1480	1504	1534	1484	1519	1504	1,4
ligne c	1488	1520	1518	1531	1524	1509	1464	1503	1529	1506	1463	1484	1503	1,6
ligne d	1517	1500	1518	1524	1533	1529	1497	1508	1528	1522	1461	1491	1511	1,4
ligne e	1504	1492	1499	1472	1473	1503	1471	1483	1498	1501	1497	1457	1488	1,1
ligne f	1480	1482	1468	1505	1478	1498	1438	1502	1503	1488	1510	1515	1489	1,4
ligne g	1493	1465	1478	1493	1512	1507	1457	1460	1481	1483	1475	1500	1484	1,2
ligne h	1545	1516	1504	1519	1517	1496	1466	1487	1504	1497	1468	1457	1498	1,7
moyenne	1501	1497	1500	1510	1500	1501	1469	1489	1505	1499	1480	1494	<b>1495</b>	
CV %	1,7	1,4	1,4	1,3	1,6	1,1	1,3	1,0	1,1	1,5	1,1	1,8		<b>1,5</b>



**11.5 Relation dose-réponse**

Afin d'évaluer cette caractéristique du test ELISA, des dilutions 2 X en série de plusieurs groupages de sérums individuels avec une réactivité hétérogène ont été testés. Ci-dessous sont illustrés des résultats typiquement obtenus. Une relation approximativement linéaire entre la concentration de l'échantillon et le rapport résultat est restreinte aux valeurs de rapport < 2. Ceci est dû à une évaluation de type qualitative (voir point 9) ce qui contraste avec les tests ELISA qui sont évalués quantitativement au moyen d'une courbe standard.



## 11.6 Précision

Pour l'évaluation de la précision du test, la variabilité des résultats dans les conditions suivantes a été déterminée :

- intra-test et entre trois tests,
- entre 3 opérateurs et
- entre deux lots de kits.

### a. Variabilité intra-test et inter-tests (n = 24 et 72, respectivement)

		variabilité (CV, %)	
échantillon	rapport	intra-test	inter-tests
1	1,2	3,0	3,3
2	3,2	2,0	3,0
3	4,9	1,8	4,1

### b. Variabilité entre opérateurs (n = 12)

échantillon	rapport	variabilité (CV, %)
1	1,2	1,7
2	3,2	1,7
3	4,7	1,8

### c. Variabilité entre 2 lots de kits (n = 6)

échantillon	rapport	variabilité (CV, %)
1	1,0	11,9
2	2,9	11,9
3	4,4	9,2

## 11.7 Distribution fréquentielle pour ANA (IgG)

Ce paramètre a été analysé sur un ensemble de sérums provenant de donneurs répartis équitablement par sexe et âge, et un ensemble de sérums qui se sont révélés positifs par d'autres méthodes (p. ex. test ELISA de référence monospécifiques est conformes CE, analyses par immunofluorescence [IFA]) pour au moins un paramètre ou qui étaient cliniquement définis.

La distribution récapitulative suivante a été observée pour les analytes (e = écart-type)

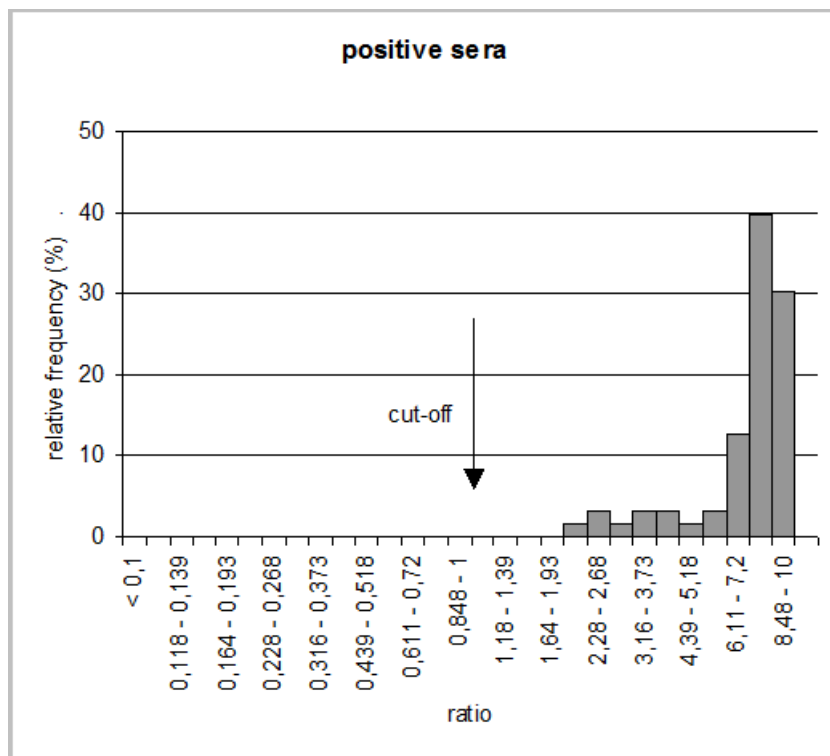
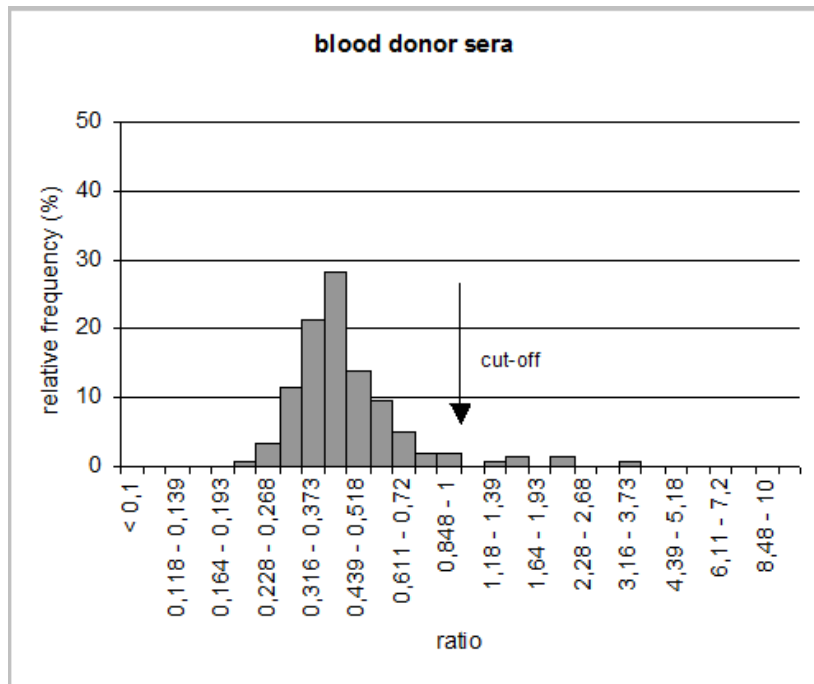
### sérums de donneurs de sang

n :	160
moyenne :	rapport = 0,49
moyenne + e :	rapport = 0,84
moyenne + 2e :	rapport = 1,19
médiane :	rapport = 0,40
95 <sup>e</sup> centile :	rapport = 0,94

### sérums positifs

n :	63
moyenne :	rapport = 7,3
moyenne - s :	rapport = 5,4
moyenne - 2e :	rapport = 3,5
médiane :	rapport = 7,8
5 <sup>e</sup> centile :	ratio = 2,9

Une analyse de la courbe ROC issue de ces données a été utilisée pour déterminer le seuil du test ANA Screen 6 ELISA selon (6). Les données présentées ici suggèrent pour le test ELISA une spécificité du diagnostic de 96 % et une sensibilité de près de 100 %. Ces valeurs s'appliquent aux sérums testés uniquement, d'autres ensembles de sérums peuvent donner des résultats différents.



## 12 GARANTIE

DRG garantit que le produit livré a été testé scrupuleusement afin de s'assurer que les propriétés exposées dans le présent document soient totalement respectées. Aucune autre garantie n'est apportée.

Les données de performance présentées dans ce document ont été obtenues en utilisant les procédures décrites. Toute modification de procédure peut impacter les résultats. Le cas échéant, DRG décline toute garantie, qu'elle soit explicite, implicite ou légale. De plus, DRG décline toute responsabilité pour les dommages directs, indirects ou consécutifs résultant d'une utilisation ou d'un stockage appropriés du produit.

**13 RECAPITULATIF**

- a. Diluer les échantillons à 1/100 dans le tampon d'échantillon (100 mL, prêt à l'emploi, orange) et mélanger.
- b. Diluer le tampon de lavage concentré 10 X (100 mL, bleu) dans de l'eau et mélanger.
- c. Laver les puits une fois avec 350 µL de tampon de lavage pour chacun.  
Distribuer 100 µL de chaque contrôle (3,0 mL chacun, prêts à l'emploi, vert et rouge) et des échantillons dilués dans les puits de la phase solide. Il est recommandé d'effectuer des mesures en double.  
Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (23 °C ± 3 °C).
- d. Laver les puits 4 fois avec 350 µL de tampon de lavage pour chacun.
- e. Distribuer 100 µL du conjugué (14 mL, prêt à l'emploi, rouge) dans les puits.  
Incuber comme à l'étape c.
- f. Renouveler l'étape de lavage d.
- g. Distribuer 100 µL de la solution de substrat (14 mL, prêt à l'emploi, flacon noir) dans chaque puits.  
Incuber comme à l'étape c.  
Puis, ajouter 100 µL de solution d'arrêt (14 mL, prêt à l'emploi, incolore) par puits et agiter brièvement la plaque.
- h. Mesure immédiatement l'absorbance à 450 nm.
- i. Évaluation :  
Déterminer l'absorbance limite en multipliant l'absorbance du contrôle positif par le facteur indiqué dans le certificat d'analyse. Puis calculer le rapport des échantillons en divisant leur absorbance par l'absorbance limite.



## 1 INTRODUÇÃO E CONTEXTO

Os autoanticorpos em circulação contra diversos antígenos intracelulares (anticorpos antinucleares, ANA) são característicos de doenças reumáticas sistémicas e autoimunes do tecido conjuntivo (1, 2, 3, 4). Estas abrangem Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), Doença Mista do Tecido Conjuntivo (DMTC), Síndrome de Sjögren (SS) A e B, Esclerose Sistémica Progressiva (ES, Esclerodermia) e Polimiosite (PM).

O diagnóstico das doenças acima mencionadas é muitas vezes difícil devido à sobreposição de sintomas e, portanto, é geralmente suportado pela medição dos respetivos anticorpos associados. Na fase sólida do presente ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) são imobilizados 6 autoantígenos especificamente reconhecidos por estes anticorpos:

<b>antígeno</b>	<b>fonte</b>	<b>doença</b>	<b>prevalência de autoanticorpos (5)</b>
RNP (proteínas A, C, 68kDa)	recombinante	DMTC	95%
		LES	30 - 40%
		PM	14%
		SS	4%
Sm (proteínas B, B', D)	timo de bovino	LES	12 - 39%
		DMTC	7%
SS-A/Ro (proteína 60kDa)	timo de bovino	SS	60 - 100%
		LES	45 - 50%
		DMTC	15 - 30%
		ES	5 - 7%
		PM	5 - 7%
SS-B/La	recombinante	SS	30 - 90%
		LES	15 - 30%
		DMTC	5 - 15%
Scl-70 (topoisomerase 1 do ADN)	recombinante	ES	20 - 76%
Jo-1 (Histidil-tARN sintetase)	recombinante	PM	20 - 40%

O teste foi concebido para a determinação sumária e qualitativa dos respetivos autoanticorpos (IgG) no soro humano ou plasma (ver secção 7), sem a capacidade de discriminação entre estes. Destina-se a ser utilizado como teste de rastreio inicial para um diagnóstico global das doenças acima mencionadas. O teste é rápido (tempo de incubação 30 / 30 / 30 minutos) e flexível (reagentes prontos a usar e de fase sólida divisível). Um controlo positivo e um negativo verificam o desempenho do ensaio. O controlo positivo também serve como calibrador para a avaliação do ensaio.

## 2 ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- O kit de teste destina-se apenas à realização de diagnósticos *in vitro* e não à utilização interna ou externa em humanos ou animais. Deve ser executado por pessoal treinado.
- Não utilize os reagentes após as respetivas datas de validade. Recomenda-se vivamente o cumprimento do protocolo.
- O tampão de amostra e os controlos contêm azida de Na como conservante. O tampão de lavagem contém bromonitrodioxano e o conjugado de metilisotiazolinona/bromonitrodioxano como conservante. O substrato contém 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A solução de paragem, 0,2 M de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), é ácida e corrosiva.
- Os reagentes acima mencionados podem ser tóxicos se ingeridos. Siga as precauções de rotina no manuseamento de químicos perigosos. Evite qualquer contacto com o corpo e utilize luvas e proteção para os olhos. Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou as mucosas, lave abundantemente com água. Nunca pipete com a boca. Elimine de acordo com a regulamentação nacional/local.
- A azida de Na pode reagir quando em contacto com canalizações de chumbo e cobre e formar azidas metálicas explosivas. Ao eliminar, adicione água abundante para evitar a acumulação de azidas.
- Os controlos contêm componentes de origem humana. Estes apresentaram resultados negativos quando testados para antígenos do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)-Ag, antígenos de superfície da hepatite B (HBs)-Ag, anticorpos do HIV 1/2-Ab e para anticorpos do Vírus da Hepatite C (HCV)-Ab, em testes de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/CE ou aprovados pela FDA.
- No entanto, não há conhecimento de nenhum teste capaz de garantir que produtos derivados de sangue humano não estejam contaminados. Como tal, devem ser manuseados como passíveis de transmitir agentes infecciosos e descartados de forma adequada. Consulte o Centro de Prevenção e Controlo de Doenças (CDC - Center of Disease Control, Atlanta, EUA) ou outras diretrizes nacionais/locais sobre procedimentos laboratoriais de segurança e descontaminação.

### 3 PRINCÍPIO DO TESTE

Os poços da fase sólida são revestidos com uma mistura equilibrada de autoantígenos referidos acima. Nesta superfície, ocorrem as seguintes reações imunológicas:

- 1ª reação: Os anticorpos específicos de antígenos presentes na amostra ligam-se ao antígeno imobilizado, formando o complexo antígeno/anticorpo. De seguida, os componentes da amostra não ligados são removidos da fase sólida.
- 2ª reação: É adicionado um segundo anticorpo, dirigido aos anticorpos IgG humanos e conjugado com peroxidase de rábano (HRP). Este conjugado liga-se ao complexo. De seguida, o conjugado em excesso é removido da fase sólida.
- 3ª reação: O complexo marcado com enzima transforma um substrato incolor num produto azul. O grau de desenvolvimento da cor reflete a concentração de autoanticorpos específicos de antígenos (IgG) presentes na amostra.

### 4 COMPONENTES DO KIT

- a. **1 placa de micropoços**, revestida com uma mistura de antígenos acima mencionados e embalada hermeticamente numa bolsa de papel de alumínio com um saco de dessecante. A placa é constituída por 12 tiras, podendo cada uma destas ser dividida em 8 poços individuais.

MWP	12x8
-----	------

- b. **Tampão de amostra**, 100 mL, pronto a usar, cor de laranja. Contém solução salina tamponada com Tris (TBS), albumina de soro bovino (BSA), Tween e  $\text{NaN}_3$ .

BUF	SPL
-----	-----

- c. **Tampão de lavagem**, 100 mL, concentrado 10x, azul. Contém TBS, Tween e bromonitrodioxano.

BUF	WASH	10x
-----	------	-----

- d. **Controlo positivo e negativo**, 3,0 mL cada, pronto a usar, verde e vermelho, respetivamente. Contém TBS, BSA, Tween e  $\text{NaN}_3$ .

CONTROL	-
---------	---

CONTROL	+
---------	---

- e. **Conjugado HRP IgG anti-humana**, 14 mL, pronto a usar, vermelho. Solução tamponada contendo proteína estabilizadora, metilisotiazolinona e bromonitrodioxano.

CONJ	IgG
------	-----

- f. **Solução de substrato**, 14 mL, pronta a usar, incolor. Contém uma solução tamponada de TMB e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Contida num frasco opaco.

SUBS	TMB
------	-----

- g. **Solução de paragem** (0,2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), 14 mL, incolor, pronta a usar. Atenção: o ácido sulfúrico é corrosivo.

SOLN	STOP
------	------

- h. Instruções de utilização  
i. Certificado específico do lote da análise

### 5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- a. Água desionizada ou destilada  
b. Proveta graduada, 1000 mL  
c. Tubos para diluição da amostra (recomenda-se tubos de transferência no formato de placa de micropoços)  
d. Pipetas para 10, 100 e 1000  $\mu\text{L}$  (recomenda-se pipetas de 1 e 8 canais)  
e. Sistema de lavagem de placa de micropoços (opcional)  
f. Leitor de placa de micropoços com um filtro de 450 nm  
g. Programa de avaliação ELISA (recomendado)

### 6 CONSERVAÇÃO DO KIT

Conserve entre 2 °C - 8 °C. Mantém-se estável até à data de validade indicada no rótulo da embalagem. Não utilize o kit após a respetiva data de validade.

## 7 REQUISITOS / PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E DO REAGENTE

Não troque nem reúna componentes correspondentes de diferentes kits, devido à possibilidade de haver condições de conservação e transporte eventualmente diferentes.

Se o kit for utilizado em várias porções, apenas os volumes necessários para o teste atual devem ser retirados dos diferentes frascos. É muito importante que não haja contaminação cruzada entre os reagentes! Utilize apenas pipetas limpas; não devolva os resíduos de reagente aos frascos originais.

- Antes de abrir a bolsa da fase sólida, esta deve atingir a temperatura ambiente. Remova os micropoços supranumerários da estrutura e volte a colocá-los de imediato na bolsa, juntamente com o saco de dessecante. Volte a fechar hermeticamente a bolsa e mantenha-a em local refrigerado para utilização futura.
- Dilua o tampão de lavagem concentrado 10x (100 mL, azul) com 900 mL de água desionizada. Misture bem. O tampão diluído mantém-se estável durante várias semanas se conservado em local refrigerado (2 °C - 8 °C).

c. Preparação das amostras:

Trate as amostras do doente como sendo passíveis de transmitir agentes infecciosos.

**Além do soro, o plasma tratado com EDTA, citrato ou heparina é também um material de amostra adequado.**

Requisitos da amostra: as amostras com contaminação microbiana, hemolisados ou altamente lipêmicos podem originar resultados errôneos e devem ser evitados.

Prepare as amostras utilizando as técnicas laboratoriais normais e dilua-os de acordo com uma proporção de **1:100** (por exemplo: 10 µL de soro / plasma + 990 µL de tampão de amostra). Misture bem.

Para uma rápida distribuição durante o processo de ensaio, recomenda-se a preparação dos controlos e das amostras em tubos de transferência de micropoços. Tal permite a utilização de uma pipeta de 8 canais durante o procedimento de ensaio.

Se as amostras não forem analisadas de imediato, devem ser conservadas entre 2 °C - 8 °C e analisadas no espaço de 3 dias. Para um período maior de conservação, recomenda-se uma temperatura de -20 °C ou mais baixa. Deve ser evitada a congelação e descongelação repetidas das amostras. As amostras descongeladas devem ser misturadas antes de serem diluídas.

## 8 PROCEDIMENTO DO ENSAIO

### 8.1 Manual

Antes de começar o ensaio, todos os componentes do kit devem ter atingido a temperatura ambiente (23 °C ± 3 °C).

Para alcançar melhores resultados, ou seja a relação máxima entre o sinal de fundo e o sinal específico, é necessária uma **lavagem mais cuidadosa** (passos a, c e e). É **extremamente importante remover na totalidade a solução de lavagem**. Para esse efeito, dê algumas pancadas firmes nas várias camadas de tecido absorvente da placa. Os sistemas de lavagem automáticos devem ser verificados de acordo com os resultados obtidos através da lavagem manual.

- Imediatamente antes da utilização, lave a fase sólida uma vez:  
enchá cada um dos poços com **350 µL de tampão de lavagem**, mergulhe nos poços durante cerca de 10 segundos e remova.
- Distribua rapidamente os **controlos** e as **amostras diluídas** nos micropoços; **100 µL** por poço.  
Recomendam-se medições duplicadas.  
*Incube a placa durante 30 minutos à temperatura ambiente (23 °C ± 3 °C).*
- Lave os poços 4 vezes conforme indicado no passo a.
- Distribua rapidamente (utilizando de preferência uma pipeta de 8 canais) o **conjugado**; **100 µL** por poço.  
*Incube a placa conforme indicado no passo b.*
- Repita a lavagem descrita no passo c.
- Distribua rapidamente (utilizando de preferência uma pipeta de 8 canais) a **solução de substrato**; **100 µL** por poço.  
*Incube a placa conforme indicado no passo b.*  
Visto que o substrato é fotossensível, evite a exposição intensa à luz (por exemplo: luz solar direta) durante a incubação.
- Distribua rapidamente (utilizando de preferência uma pipeta de 8 canais) a **solução de paragem**; **100 µL** por poço.  
Utilize a mesma sequência que para o substrato. A cor muda de azul para amarelo. Agite a placa, de preferência num agitador orbital, durante cerca de 10 segundos.
- Leia imediatamente a absorvância no fotómetro da placa de micropoços a 450 nm.

Conserve em local refrigerado os reagentes restantes (2 °C - 8 °C) se estes tiverem de ser utilizados novamente.

## 9 AVALIAÇÃO E CONTROLO DE QUALIDADE

O ensaio é avaliado de uma forma qualitativa: a absorvância das amostras é comparada com a absorvância limite (= absorvância do valor limite). A absorvância do valor limite é determinada através do controlo positivo que ao mesmo tempo funciona como calibrador, de acordo com a fórmula:

$$\text{absorvância limite} = \text{absorvância controlo positivo} \times \text{fator}$$

O fator depende do lote do kit e é mencionado no certificado específico do lote da análise (incluído com cada kit de teste).

Exemplo:

$$\begin{aligned} \text{absorvância controlo positivo} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{fator} &= 0,35 \\ \text{absorvância limite} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

Para obter uma visão do grau da reatividade da amostra, calcula-se a relação entre a amostra e a absorvância limite:

$$\text{Relação} = \text{absorvância amostra} / \text{absorvância limite}$$

Exemplo:

$$\begin{aligned} \text{absorvância limite} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{absorvância amostra} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{relação} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

### Controlo de qualidade:

O controlo positivo (calibrador) e o controlo negativo verificam o desempenho do ensaio. Os respetivos intervalos aceitáveis são mencionados no certificado específico do lote da análise. Os valores dos controlos têm de estar abrangidos nos intervalos indicados; caso contrário, os resultados do ensaio não são válidos.

## 10 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS / LIMITES DO PROCEDIMENTO

Com base nas medições de um dador de sangue e de um coletivo positivo de soros (ver abaixo), sugere-se o seguinte para a avaliação dos soros dos doentes:

	<b>Relação</b>
intervalo normal (negativo)	< 0,82
valor limite	1,00
intervalo dúbio	0,82 - 1,20
intervalo positivo	> 1,20

Estas especificações são fornecidas apenas como indicação; para verificar a respetiva exatidão, cada análise deve incluir amostras paralelas de soros normais.

Um **resultado de teste negativo** indica que, provavelmente, o doente não tem um nível elevado de anticorpos IgG para os antigénios indicados no início. Portanto, a presença de uma doença reumática sistémica é pouco provável, ainda que não possa ser excluída.

Um **resultado positivo** deve ser considerado como uma indicação para uma das doenças acima mencionadas. Como diagnóstico de seguimento, deve ser determinada a especificidade do autoanticorpo causativo e, conseqüentemente, a identidade da doença autoimune. Tal pode ser conseguido através de um ensaio ELISA de perfil diferenciador.

As amostras que apresentam resultados entre os limites acima mencionados devem ser consideradas como **dúbias** e reportadas como tal. Recomenda-se que seja efetuada a colheita de uma segunda amostra duas semanas mais tarde e executada em paralelo com a primeira amostra para documentar uma possível alteração do título do anticorpo.

Como em qualquer teste serológico, os resultados devem ser interpretados à luz dos sintomas do doente e de outros critérios de diagnóstico.

## 11 CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

### 11.1 Normalização

O teste é normalizado com uma preparação de soro purificada contendo anticorpos IgG direcionados a cada um dos autoantígenos imobilizados. Tal constitui o material de stock de ambos os controlos do teste. A proporção dos anticorpos é ajustada de tal forma que cada um contribui com aproximadamente a mesma fração para o sinal global.

A preparação de stock deve ser calibrada em função de um conjunto de soros positivos especificamente únicos e exclusivamente reservados para este fim. O grau de reatividade da amostra é expresso como uma relação breve, conforme descrito acima.

### 11.2 Especificidade de análise

O teste permite a determinação específica de anticorpos IgG humanos, direcionados aos antígenos referidos no artigo 1. Foi validada (entre outros critérios) a utilização de soros humanos de referência do Centro de Prevenção e Controlo de Doenças (CDC - Center of Disease Control, Atlanta, EUA) disponíveis no mercado. Os seguintes resultados (valores de relação) são característicos:

Soro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Resultado do CDC	ds-ADN	SS-B/La	--	U1-RNP	Sm	--	SS-A/Ro	--	Scl-70	Jo-1
Imunofluoresc. relação	homogéneo	matizado	matizado	--	--	nucleolar	--	centrómero	--	--
	2,1	8,7	7,6	3,3	8,4	1,0	6,2	0,3	6,6	8,2

*Observação:* O ANA Profile 8 ELISA, que estabelece a diferença entre os antígenos, revelou o seguinte: O soro n.º 1 reage não só com dsADN, mas também com Sm. O soro n.º 6 mostra valores de relação  $\leq 1$  face a todos os antígenos únicos. O soro n.º 8 reage fortemente com o centrómero da proteína B, não incluída no intervalo do antígeno do presente ANA Screen 6 ELISA.

### 11.3 Limite de deteção (sensibilidade analítica)

O limite de deteção é definido como a concentração de analito que corresponde à absorvância média do tampão de amostra mais 3 vezes o desvio padrão (s). Foi determinado como  $< 0,4$  (relação;  $n = 24$ ).

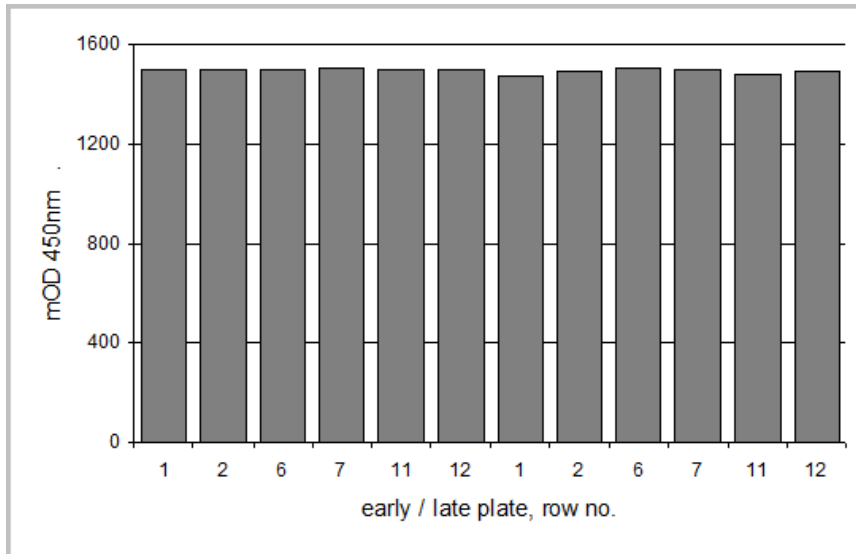
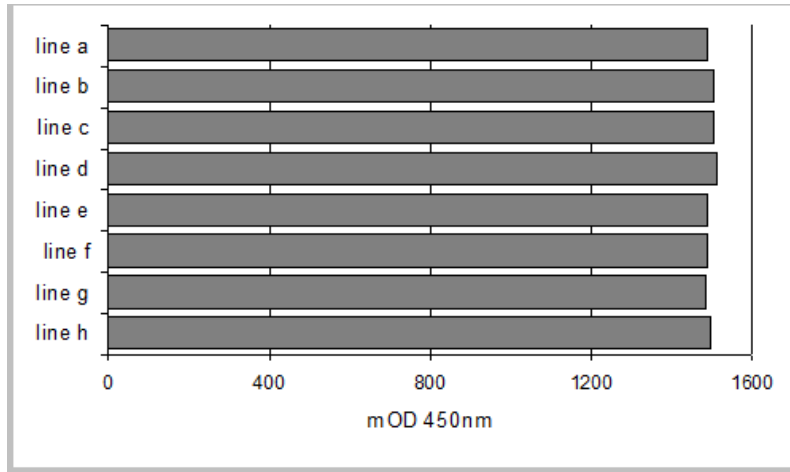
Intervalo de medição recomendado:  $0,5 < \text{relação} < 6$

### 11.4 Homogeneidade da fase sólida

A medição da homogeneidade da fase sólida faz parte do CQ regular de cada lote de produção. Tal é determinado pela medição 288 vezes de um IgG positivo, mas com uma amostra não saturada em 3 placas selecionadas.

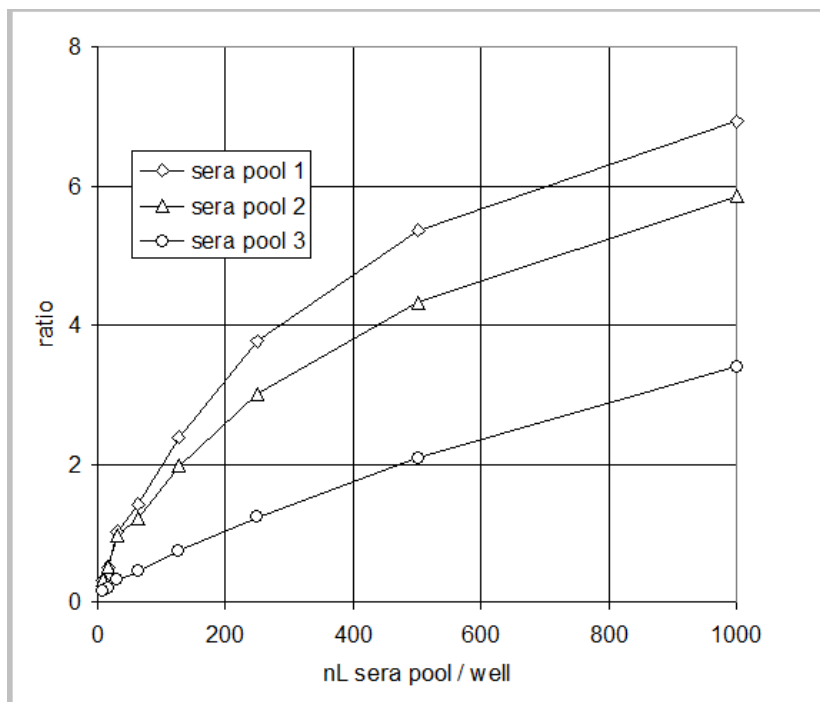
Critério de aceitação: coeficiente mOD de variação (CV) nas placas  $< 8\%$ . O quadro abaixo mostra um excerto representativo (lote da fase sólida n.º 23081) de tal análise.

placa	inicial (n=10)						tardio (9n/10)						média	CV%
	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11	12		
linha a	1464	1480	1490	1527	1476	1475	1490	1492	1495	1461	1478	1525	1488	1,4
linha b	1514	1522	1528	1511	1487	1489	1472	1480	1504	1534	1484	1519	1504	1,4
linha c	1488	1520	1518	1531	1524	1509	1464	1503	1529	1506	1463	1484	1503	1,6
linha d	1517	1500	1518	1524	1533	1529	1497	1508	1528	1522	1461	1491	1511	1,4
linha e	1504	1492	1499	1472	1473	1503	1471	1483	1498	1501	1497	1457	1488	1,1
linha f	1480	1482	1468	1505	1478	1498	1438	1502	1503	1488	1510	1515	1489	1,4
linha g	1493	1465	1478	1493	1512	1507	1457	1460	1481	1483	1475	1500	1484	1,2
linha h	1545	1516	1504	1519	1517	1496	1466	1487	1504	1497	1468	1457	1498	1,7
média	1501	1497	1500	1510	1500	1501	1469	1489	1505	1499	1480	1494	<b>1495</b>	
CV%	1,7	1,4	1,4	1,3	1,6	1,1	1,3	1,0	1,1	1,5	1,1	1,8		<b>1,5</b>



**11.5 Relação dose/resposta**

Para avaliar esta característica do ensaio ELISA, vários poços de soros individuais com reatividade heterogénea foram medidos por diluição de 2 vezes em série. Apresenta-se abaixo um resultado típico. Uma relação aproximadamente linear entre a concentração da amostra e a relação resultante é limitada a valores de relação < 2. Tal deve-se à forma de avaliação qualitativa (consultar artigo 9) e ao teste ELISA de contraste que são avaliados quantitativamente através de uma curva padrão.



**11.6 Precisão**

Para a avaliação da precisão do teste, foi determinada a variabilidade dos resultados nas seguintes condições:

- em 1 ensaio e entre 3 ensaios,
- entre 3 operadores e
- entre 2 lotes de kit.

**a. variabilidade intra e interensaio (n = 24 e 72, respetivamente)**

		variabilidade (CV, %)	
amostra	relação	intraensaio	interensaio
1	1,2	3,0	3,3
2	3,2	2,0	3,0
3	4,9	1,8	4,1

**b. Variabilidade de operador para operador (n = 12)**

amostra	relação	variabilidade (CV, %)
1	1,2	1,7
2	3,2	1,7
3	4,7	1,8

**c. Variabilidade entre 2 lotes de kit (n = 6)**

amostra	relação	variabilidade (CV, %)
1	1,0	11,9
2	2,9	11,9
3	4,4	9,2

**11.7 Distribuição da frequência de ANA (IgG)**

A distribuição da frequência foi analisada num coletivo de soros de dadores de sangue, distribuído igualmente por sexo e idade, e num coletivo de soros que se verificaram positivos através de métodos independentes (por exemplo: testes ELISA monoespecíficos de referência com certificado CE de conformidade, ensaios de imunofluorescência (IFA)) para, pelo menos, um parâmetro ou que foram clinicamente determinados.

Observou-se a seguinte distribuição sumária de analitos (s = desvio padrão):

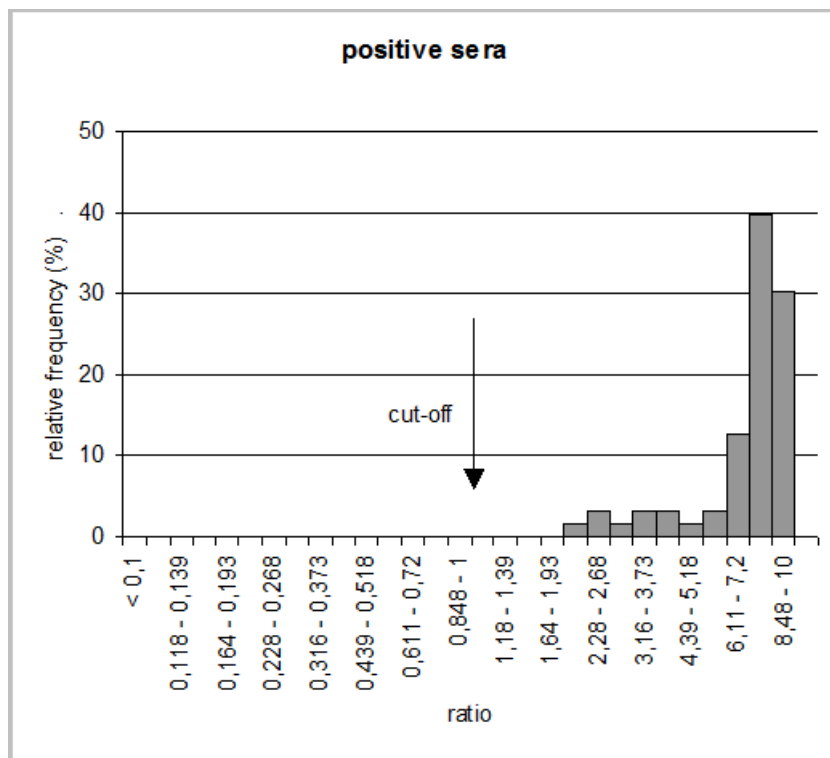
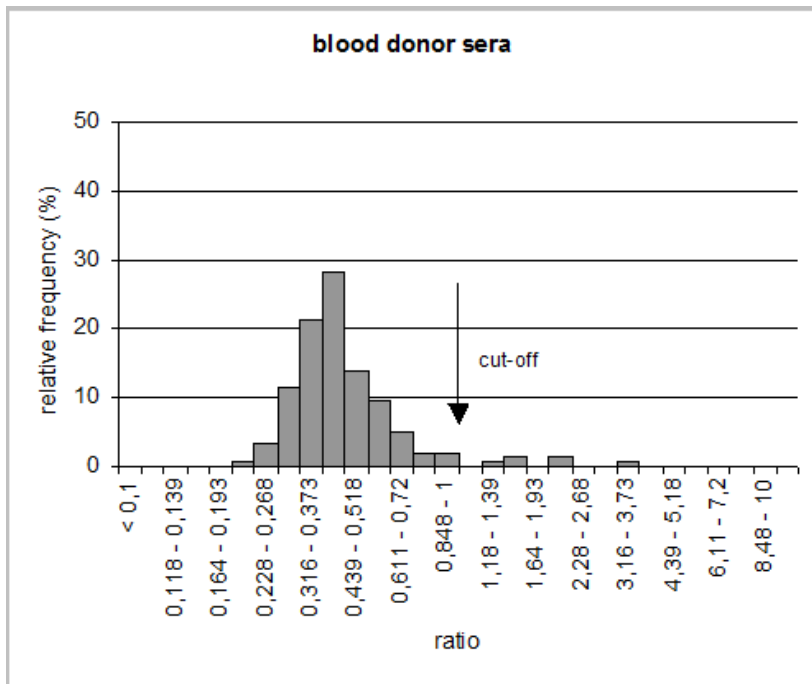
**soros de dadores de sangue**

n:	160
média:	relação = 0,49
média + s:	relação = 0,84
média + 2s:	relação = 1,19
mediana:	relação = 0,40
percentil 95:	relação = 0,94

**soros positivos**

n:	63
média:	relação = 7,3
média - s:	relação = 5,4
média - 2s:	relação = 3,5
mediana:	relação = 7,8
percentil 5:	relação = 2,9

Utilizou-se a análise da curva ROC destes dados para determinar o valor limite do ANA Screen 6 ELISA de acordo com (6). Os dados aqui apresentados sugerem uma sensibilidade e especificidade de diagnóstico do teste ELISA de cerca de 96 e praticamente 100%, respetivamente. Estes valores aplicam-se apenas aos soros medidos; outros coletivos podem produzir resultados diferentes.



**12 GARANTIA**

A DRG garante que o produto entregue foi minuciosamente testado para garantir que foram cumpridas as respetivas propriedades aqui descritas. Não são dadas outras garantias.

Os dados de desempenho aqui apresentados foram obtidos através do procedimento indicado. Qualquer alteração ao procedimento pode afetar os resultados, caso em que a DRG rejeita a prestação de quaisquer garantias, sejam expressas, implícitas ou estatutárias. Além disso, a DRG não se responsabiliza por quaisquer danos, sejam diretos, indiretos ou acidentais, resultantes da utilização ou conservação indevida do produto.














**13 FLUXOGRAMA DE SÍNTESE**

- a. Dilua os amostras de acordo com uma proporção de 1:100 no tampão de amostra (100 mL, pronto a usar, cor de laranja) e misture.
- b. Dilua o tampão de lavagem concentrado 10x (100 mL, azul) com água e misture.
- c. Lave cada um dos poços uma vez com 350 µL de tampão de lavagem.  
Distribua 100 µL dos controlos (3,0 mL de cada, prontos a usar, verde e vermelho) e das amostras diluídas nos poços da fase sólida. Recomendam-se medições duplicadas.  
Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente ( $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
- d. Lave cada um dos poços 4 vezes com 350 µL de tampão de lavagem.
- e. Distribua pelos poços 100 µL do conjugado (14 mL, pronto a usar, vermelho).  
Incube conforme indicado no passo c.
- f. Repita a lavagem descrita no passo d.
- g. Distribua 100 µL da solução de substrato (14 mL, pronta a usar, frasco preto) por poço.  
Incube conforme indicado no passo c.  
De seguida, adicione 100 µL da solução de paragem (14 mL, pronta a usar, incolor) por poço e agite a placa rapidamente.
- h. Meça imediatamente a absorvância a 450 nm.
- i. Avaliação:  
Determine a absorvância limite multiplicando a absorvância do controlo positivo pelo fator referido no certificado da análise. De seguida, calcule a relação da amostra dividindo a respetiva absorvância pela absorvância limite.

**14 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFIA / PUBLICATIONS / LITERATURA**

1. Nakamura, R. M., Tan, E. M.: Update on autoantibodies to intracellular antigens in systemic rheumatic diseases. Clin Lab Med 12 (1992), 1 - 23
2. Guma, M., Keil, L. B.: Autoantibodies to cellular antigens in systemic autoimmune diseases. J Clin Immunoassay 17 (1994), 98 - 107
3. Fritzler, M. J.: Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. Mol Biol Rep 23 (1996), 133 - 145
4. Hietarinta, M., Lassila, O.: Clinical significance of antinuclear antibodies in systemic rheumatic disease. Ann Med 28 (1996), 283 - 291
5. Messinger, M.: Autoantikörper bei systemischen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen (Kollagenosen). In: L. Thomas (ed.): Labor und Diagnose (2005), TH-Books-Verlags-Gesellschaft, Frankfurt/Main, 1139 - 1161
6. Sommer, R., and Eitelberger, F.: Wertigkeit der Gliadin-Antikörper im Serum zur Diagnose der Zöliakie. Wien Klin Wochenschr 104/4 (1992), 86 – 92

## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation	Consultar as instruções de utilização *
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Ref.º do catálogo
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código de lote
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Contém o suficiente para <n> testes
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation	Limite de temperatura
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Data de validade
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante
	Caution *	Achtung *				Atenção
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches	Apenas para fins de investigação
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuição
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité	Volume/Quantidade