

RELISA® SCREENINGTEST AV ANA

För diagnostisk användning in vitro

För yrkesmässigt bruk

Katalognummer: 7096-11 (96 brunnarna) och 7696-11 (576 brunnarna)

AVSEDD ANVÄNDNING: Detta är ett enzymimmunanalystestsystem för detektion av antinukleära antikroppar i humanserum. Detta testsystem skall användas som ett hjälpmedel vid detektion av antikroppar som är associerade med systemisk reumatisk sjukdom.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET

Antinukleär antikropp (ANA) är en allmän term som används för att beskriva autoantikroppar mot olika cellnukleära proteiner. Tidiga studier av dessa autoantikroppar med hjälp av immuofluorescerande teknik uppvisar ett litet antal nukleärproteinspecificiteter (1). Tack vare det höga sambandet mellan positiv ANA och systemisk lupus erythematosus (SLE) utesluter negativ ANA i stort sett sjukdomen (2).

Även om DNA-specifika antikroppar fortfarande hänger starkt samman med SLE (3), har även ett antal nukleära (4) och cytoplasmiska (5-7) makromolekyler upptäckts och associerats med andra bindvävssjukdomar (8-10). Vissa av dessa antikroppar har diagnostisk och/eller prognostisk betydelse vid progressiv systemisk skleros (11-12), blandad bindvävssjukdom (13-15) Sjögrens syndrom (16-17), polymyosit (18), och/eller reumatoid artrit (19). Tack vare dessa sjukdomsassociationer har ANA-testning nu etablerats som screeningmetod för bindvävssjukdom (20).

Den vanligaste metoden för att testa ANA är den indirekta fluorescerande antikroppsmetoden (IFA) med hjälp av odlade celler. Dessa analysers sensitivitet varierar beroende på vilken typ av substrat och vilka fixativmetoder som används, samt vilka ANA-typer som finns i serumet. Det IFA-test som använder HEp-2 eller HEp-2000®-celler bedöms vara ett känsligt test för detektion av ANA, men det är i hög grad koncentrerat på laboratoriearbete och utsatt för felkällor i form av olika fluorescerande mikroskop och människors tolkningar.

Enzymimmunanalyser (EIA) är ett alternativ till IFA-metoden. EIA-testsystem kan på ett effektivt sätt screena ett stort antal prover. Den mänskliga faktorn reduceras och resultatet förmedlas på ett objektivt sätt. Emellertid har det rapporterats att EIA-metoderna uppvisar både falskt positiva och falskt negativa resultat jämfört med IFA-metoderna (21).

TESTPRINCIP

Detta test är en kvalitativ indirekt EIA. Mikrobrunnarnas yta har belagts med stabiliserade antigener (dsDNA, histoner, SSA/Ro, SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centromer, PCNA, Ribosomal P, M2 och andra antigener extraherade från HEp-2-kärnan och cytoplasman) som fungerar som antigensubstrat i detta system. Spädningar av patientproven placeras i mikrobrunnarna och odlas så att de specifika antikropparna i provet reagerar med antigenen i den fasta fasen. Efter tvättning för att avlägsna obunden antikropp och annat seraprotein, odlas brunnarna med getantihumana antikroppar som är märkta med pepparrotperoxid. Det pepparrotperoxidaskonjugerade antikropppreparat som ingår i detta testsystem är specifikt för humana IgG-tunga och -lätta kedjor.

Om resultaten är positiva efter inkubation med konjugat av pepparrotperoxid, bildas ett stabilt komplex i tre delar. Detta komplex består av en antihuman antikropp konjugerad med pepparrotperoxid som är bunden till en human antinukleär antikropp, vilken i sin tur är bunden till den antigen som stabiliserats på plastytan.

Efter ännu ett tvättsteg detekteras detta komplex genom tillsättande av en lösning av tetrametylbensidin (TMB) och H₂O₂ som kromogent substrat. Graden av färgutveckling i varje brunn står i relation till koncentrationen av antinukleära antikroppar i respektive serumprov. Varje mikrobrunn avläses i spektrometer vid 450 nm.

SYSTEMKOMPONENTER – MATERIAL SOM MEDFÖLJER

Förvaring: Alla komponenter skall kylförvaras i 2-10°C. Får ej frysas.



Stabilitet: Alla komponenter förblir stabila i minst tolv månader från tillverkningsdatum. Använd inte komponenterna efter utgångsdatum.



REAKTIVA REAGENSER

RELISA® antigen kotade mikrotiter brunnar [PLATE]: Katalognummer 7008-11. En mikrotitbrunn ram innehållande tolv åtta brunn strips kotade med atomära antogener (dsDNA, histones, SSA/Ro, SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centromere, PCNA, Ribosomal P, M2, och andra antigener framställda från HEp-2 celler). Dessa strips är plommon färgkodade. Om mindre än åtta brunnar behövs för testet kan brunnarna separeras genom att knäppa dem itu. De oanvända stripsen kan förvaras i foliepåsen i kyla upp till 45 dagar.

RELISA® provspädningsvätska [SOLN|DIL]: Katalognummer 7100 (100 ml). Patentskyddad buffrad provspädningsvätska för spädning av patientprov.

RELISA® enzymantikroppreagens - human IgG tung- och lättkedjespecifik [CONJ|HRP]: Katalognummer 7009-11 (14 ml). Antihuman IgG (H och L) konjugerad med pepparrotperoxid (HRP). Reagensen är färdig att använda.

RELISA® substratlösning [SOLN|SUB]   : Katalognummer 7035 (14 ml). HRP-specifik enzymsubstratlösning innehållande stabiliserad 3,3',5,5'-tetrametylbensidin (TMB) och väteperoxid (H₂O₂). Reagensen är färdig att använda. **WARNING:** Brandfarligt. Detta reagens innehåller mindre än 25% metanol och aceton. Förvaras utom räckhåll för barn. Vid kontakt med ögonen, spola omedelbart och noggrant med vatten och kontakta en läkare.

RELISA® stoppreagens [SOLN|STOP]   : Katalognummer 7033 (14 ml). Patentskyddad stoppreagens för Immuno Concepts EIA-testsystem. Reagensen är bruksfärdig. **FARA:** Frätande. Denna reagens innehåller hydrokloriska och svavelhaltiga syror (mindre än 3 % vardera per volym) och skall hanteras med varsamhet. Förvaras utom räckhåll för barn. Om du råkar röra vid ögonen i samband med hantering skall du omedelbart spola noggrant med vatten och kontakta läkare. Tillsätt aldrig vatten till denna reagens.

RELISA® ANA kalibratorserum [CAL]: Katalognummer 7026-11 (2 ml). Humanserum som innehåller antinukleära antikroppar. Analysvärdet för detta serum står angivet på ampulletiketten. Detta serum är färdigspätt och kan användas direkt.

RELISA® ANA positiv kontroll [CONTROL|+]: Katalognummer 7021-11 (2 ml). Positiv kontroll av humant serum som innehåller antinukleära antikroppar. Detta serum är färdigspätt och kan användas direkt.

RELISA® ANA negativ kontroll [CONTROL|-]: Katalognummer 7031 (2 ml). Negativ kontroll av humant serum som inte innehåller antinukleära antikroppar. Detta serum är färdigspätt och kan användas direkt.

RELISA® Tillhörande ANA utspädd och positiv kontroll [OPT+]: Katalognummer 7022-11 (0,25 ml). Positiv kontroll av humant serum som innehåller antinukleära antikroppar. Behandla denna positiva kontroll som ett utspätt serum.

ICKE-REAKTIVA KOMPONENTER

Hållare för mikrobrunnar

Tvättbuffertlösning:

PBS-buffert [PWDR|PBS]: Katalognummer 1011. Fosfatbuffrat saltlösningpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Varje påse innehåller tillräckligt med buffertpulver för att ge en liter. (Två påsar buffertpulver medföljer varje 96-mikrobrunnspatta i kompletta testsatser).

Tvättbuffertkoncentrat SOLNIWASH: Katalognummer 1031 (10 ml). 5% Tween-20-lösning för användning i tvättbufferten. (Två ampuller med buffertkoncentrat levereras för varje 96-mikrobrunnspatta i kompletta testsatser).

Framställning: Lös upp en påse med buffertpulver i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. Tillsätt hela innehållet i en flaska tvättbuffertkoncentrat i den upplösta fosfatbuffrade saltlösningen. Blanda väl och förvara i 2-25°C i upp till fyra veckor eller tills det syns tecken på kontamination eller andra synliga förändringar. Tvättbuffertlösning måste stå i rumstemperatur (18-25°C) före användning.

ÖVRIGHT MATERIAL SOM BEHÖVS – MEDFÖLJER EJ

Volymetriska precisionspipetter för pipettering av 25-1000 µl volymer
Klämfaska för pipettering av tvättbuffertlösning till mikrobrunnarna eller till ett automatiserat eller halvautomatiserat tvättsystem för mikrobrunnar
Enlitersbehållare för PBS-tvättbuffertlösning
Avjoniserat eller destillerat vatten
Plattläsningspektrometer som kan avläsa absorption vid 450 nm
Provrör för framställning av serumspädningar
Läskapper eller pappershanddukar
Multikanalspipett som kan pipettera 8 brunnar
Engångshandskar
Laborietidur

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. Allt material av humant ursprung som använts i den här produkten har testats med FDA-godkända metoder och visat sig vara negativt (inte upprepat reaktivt) för antikroppar mot humant immunbristvirus-1 (HIV-1), humant immunbristvirus-2 (HIV-2), hepatit C-virus (HCV) och hepatit B ytantigen (HBsAg). Ingen testmetod kan emellertid helt garantera att det inte förekommer HIV-1, HIV-2, hepatit-C, hepatit-B, eller andra smittämnen. Därför skall allt satsmaterial hanteras som potentiellt smittsamt.
2. Alla patientprover på biosäkerhetsnivå 2 skall hanteras enligt rekommendationerna för potentiellt smittsamt humanserum eller blodprov i Centrum för Sjukdomskontroll/Nationella hälsoinstitutets manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Spädning av komponenter eller byte till andra komponenter än de som medföljer detta system kan ge motsägande resultat.
4. Natriumazid (0,09%) används som konserveringsmedel. Natriumazid kan reagera med ledningsrör av bly eller koppar och bilda explosiva metallazidsalter. När reagenser kasseras, skall man spola med rikliga mängder kranvatten för att skölja bort eventuella rester i avloppsledningarna. Natriumazid är ett gift och kan vara toxiskt vid förtäring.
5. Denna sats är avsedd för diagnostisk användning *in vitro*.
6. Pipettera aldrig med munnen och undvik att komma i kontakt med reagenser och prov med hud eller slemhinnor. Tvätta med bakteriedödande tvål och rikligt med vatten om sådan kontakt inträffat.
7. Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prov eller satsreagenser hanteras.
8. Undvik alltid stänk och alstring av aerosoler.
9. Andra inkubationstider och temperaturer än de angivna kan ge felaktiga resultat.
10. Korskontamination mellan reagenser och prover kan ge felaktiga resultat. Proverna måste hela tiden hållas instängda i mikrobrunnarna under analysen.
11. Återanvändningsbart glas måste tvättas och noggrant sköljas från rengöringsmedel innan det används. Allt glas måste rengöras och torkas före användning.
12. Placera alla reagenser, mikrofördjupningar och prover i rumstemperatur (18-25°C) före användning.
13. Använd engångshandskar vid hantering av prover och reagenser, och tvätta händerna noggrant efteråt.
14. Mikrobiell kontamination av reagenser eller prover kan ge felaktiga resultat.
15. Stoppreagensen är frätande och kan orsaka brännskador. Denna reagens innehåller hydrokloriska och svavelhaltiga syror (mindre än 3 % vardera per volym) och skall hanteras med varsamhet. Förvaras utom räckhåll för barn. Om du råkar röra ögonen vid hantering skall du omedelbart spola med vatten och kontakta läkare. Tillsätt aldrig vatten i denna reagens.

PROVTAGNING

Provtagning: Serum rekommenderas som prov. Cirka 5 ml helblod skall tas aseptiskt genom venpunktion med hjälp av ett sterilt vakuumbloodtagningrör eller annat lämpligt blodtagningssystem. Låt blodet koagulera i rumstemperatur (18-25°C). Serum skall så snart som möjligt separeras från koagler genom centrifugering för att minimera hemolys.

Störande substanser: Sera som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus, lipemi eller mikrobiell tillväxt skall inte användas, eftersom dessa betingelser kan leda till avvikande resultat. Prover som innehåller synliga partiklar bör klagöras genom centrifugering före testning.

Förvaring: Sera kan förvaras i 2-10°C under högst en vecka. Om analysen fördröjs ytterligare, skall sera frysas i -20°C eller lägre. Serum bör inte förvaras i självavfrostande kylskåp eller fryslagerum.

WARNING: Upprepad frysning/upptining av patientprover kan ge falskt positiva eller negativa resultat.

ALLMÄNNA PROCEDURANVISNINGAR

1. Det är ytterst viktigt att alla satskomponenter och serumprover står i rumstemperatur (18-25°C) före användning. En hel liter tvättbuffert kan ta flera timmar att värma till 20°C sedan den har tagits ur kylskåpet. Inkubationstemperaturer som ligger högre eller lägre än det angivna området kan leda till inexacta resultat. Sätt tillbaka oanvända prover och reagenser i kylförvaring efter användning.
2. Blanda reagenserna väl före användning genom försiktig inversion. Snurra eller rotera inte reagenserna. Undvik skumning.
3. När provspädningar framställs skall pipettspetsarna torkas av innan serum dispensereras i provspädningen. Överflödigt prov som sitter fast på utsidan av pipettspetsen påverkar resultaten.
4. Vi rekommenderar att en multikanalpipett används eftersom detta ger en mer enhetliga reagensdispenserings, inkubationstider och reaktionstider.
5. **Det är ytterst viktigt att brunnarna tvättas ordentligt.** Otillräckligt tvättade brunnar leder till höga bakgrundsvärden och orsaka falskt positiva resultat. Manuell tvätt: Aspirera brunnarnas innehåll och fyll därefter varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik korskontamination mellan brunnarna, särskilt i första tvätten efter aspirationen. Töm all tvättlösning från brunnarna genom att vända dem upp och ned och skaka därefter resterande tvättbuffert från brunnarna med en bestämd "knyck" med handleden. Upprepa fyll- och torkstegen för totalt tre till fem tvättar. Brunnarna skall sedan knackas bestämt mot en pappershandduk eller annat absorberande material för att avlägsna alla spår av kvarvarande tvättbuffert. Om det automatiserade tvättsystemet för mikrobrunnar används blir brunnarna genomgående tvättade, varför detta rekommenderas.
OBSERVERA: Då det finns många olika tvätteknycktyper och automatiserade program kan antalet tvättar behöva justeras för ett optimalt resultat. Varje laboratorium bör bestämma mest effektiva antal tvättar för sitt tvättsystem.
6. Om kvarvarande tvättbuffert inte avlägsnas ordentligt kan detta leda till ojämn färgutveckling. Mikrobrunnensremsorna skall läskas mot absorberande papper eller handdukar för att minimera kvarvarande tvättbuffert.
7. Det är av avgörande betydelse att alla steg sker i rätt tid. Ssamliga serumprover skall spädas innan proceduren påbörjas, och de måste dispensereras till mikrobrunnarna på så kort tid som möjligt (högst fem minuter). Batchstorlekarna skall ställas in så att provhanteringen går så smidigt som möjligt under denna tidsperiod. Prov- och reagenshanteringen underlättas med hjälp av en multikanalpipett, varför detta rekommenderas.
8. Med undantag för den sista inkubationen (substratlösningen) börjar varje inkubationstid med att prov eller reagenser dispensereras. Inkubationen av substratlösningen måste vara exakt 30 minuter för varje brunn. Alla prover och reagenser skall dispensereras i samma ordningsföljd och med konstant hastighet.

TOLKNING AV RESULTAT

BERÄKNINGAR

1. Dra ifrån absorptionsvärdet för reagensämnesbrunnen från de absorptionsvärden som erhållits i kalibrator-, kontroll- och patientprovbrunnarna. Beräkna de genomsnittliga absorptionsvärdena för dubbla brunnar.
2. Dela den specifika antikroppkoncentrationen i kalibratorserat (står angiven på etiketten) med medelabsorptionsvärdet för kalibratorbrunnarna för att erhålla konverteringsfaktorn.
3. Multiplicera absorptionsvärdena för vart och ett av proverna med denna konverteringsfaktor för att erhålla den specifika antikroppkoncentrationen i enheter.
4. Den förenklade formeln för dessa beräkningar lyder:

$$\frac{U_c}{\lambda_c} \times \lambda_s = U_s$$

U_c = Kalibratorvärde (enheter)

λ_c = Kalibratorabsorption*

λ_s = Provabsorption*

U_s = Provets enhetsvärde

*Använd duplikatbrunnarnas medelabsorption, om kalibratorer och prover körs två gånger.

KVALITETSKONTROLL

1. Kalibratorbrunnarnas genomsnittliga absorptionsvärde måste vara minst 0,400. Absorptionsvärden som är lägre än 0,400 uppvisar otillräcklig färgutveckling och en ogiltig serie. Otillräcklig färgutveckling beror vanligtvis på att kalla reagenser har använts eller att tidpunkten för ett eller flera steg i analysen varit felaktigt vald. Låt reagenserna värmas till rumstemperatur (18-25°C) och upprepa serien med beaktande av valet av tidpunkt för varje steg.
2. Den färglösa kontrollbrunnen skall ha ett absorptionsvärde på mindre än 0,150. Färglösa absorptionsvärden större än 0,150 tyder på otillräcklig tvättning eller kontamination av reagenser.
3. Prover med specifika antikroppvärden som är större än den övre gränsen av kalibratoren borde visas positiva med ett enhetsvärde "större eller lika med" enhetsvärdet som visas på etiketten på kalibrator serumet.
4. Konverteringsfaktorn måste beräknas för varje serie. Resultaten blir ogiltiga om en konverteringsfaktor från en annan serie används.
5. Varje laboratorium bör upprätta och underhålla sina egna referensintervall (normalvärden) baserat på patientpopulation och andra lokala faktorer.
6. Det positiva kontrollserat är ett humanserum som innehåller antinukleära antikroppar. Detta är en kvalitativ kontroll som bör ge ett värde större än 15 ANA-enheter.
7. Det negativa kontrollserumet är en samling humanserum som inte innehåller antinukleära antikroppar. Denna kontroll skall ge värden mindre än 10 ANA-enheter.
8. Det utspädda positiva kontrollserat är ett humanserum som innehåller antinukleära antikroppar. Denna kontroll bör ge ett värde som är större än 15 ANA-enheter.

TOLKNING AV PATIENTRESULTAT

Detta är en kvalitativ analys. Nivåerna av detekterade antikroppar har ingen känd klinisk betydelse, och de enhetsvärden som erhållits i denna analys har endast beräknats för att dela in patienter i följande tre breda grupper. Patientprovbrunnar som har beräknade värden större än eller lika med 15 ANA-enheter betraktas som positiva och skall testas med hjälp av HEp-2- eller HEp-2000®-objektglasanalys för att fastställa ANA-färgningsmönstren och för att utföra ett lämpligt uppföljande test. Patientprovbrunnar som har beräknade värden mindre än 10 ANA-enheter betraktas som negativa. Värden mellan 10 och 15 enheter anses ligga på gränsen till att vara positiva och provet skall då testas på nytt eller analyseras med HEp-2- eller HEp-2000®-objektglasanalys för att fastställa ANA-färgningsmönster och utföra ett lämpligt uppföljande test. Varje laboratorium måste upprätta sina egna referensintervall och fränslagsvärden baserat på den patientpopulation som testas. Enhetsvärden påverkas av patientfaktorerna, mekaniska överväganden (t ex pipetteringsprecision och exakthet) och analysvillkoren (t ex temperatur och val av rätt tidpunkt för stegen).

RAPPORTERING AV RESULTATET

Resultaten skall rapporteras som positiva eller negativa för antinukleära antikroppar. Antikroppnivåerna har ingen känd klinisk betydelse.

TESTETS BEGRÄNSNINGAR

1. Diagnos kan inte ställas enbart på grundval av detektion av antinukleär antikropp. Läkaren måste tolka dessa resultat i ljuset av patientens tidigare sjukdomar och symptom, de fysiska upptäckterna och andra diagnostiska metoder.
2. Behandling bör inte påbörjas enbart på grundval av ett positivt test för antinukleära antikroppar. Kliniska indikationer, andra laboratorieupptäckter och läkarens kliniska intryck måste beaktas innan behandling påbörjas.
3. Vissa läkemedel, bland annat procainamid och hydralazin, kan medföra en sjukdom liknande lupus erythematosus (22). Patienter med läkemedelsinducerad LE kan uppvisa en positiv ANA.
4. Även om en högt titrerad ANA i hög grad kan tyda på bindvävssjukdom, bör detta inte användas för diagnos, utan snarare ses som en del av en patients totala sjukdomshistoria.
5. Positiva ANA kan även förekomma hos en liten andel patienter med smittsamma och/eller neoplastiska sjukdomar (9).

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Förekomsten av autoantikroppar mot olika nukleära antigener varierar beroende på patientpopulation och förekomsten av kliniska reumatiska sjukdomar i denna population. Med hjälp av den indirekta immunfluorescerande metoden med HEp-2-celler har antinukleära antikroppar upptäckts hos 95% av patienter med systemisk lupus erytematosus, 90% av patienter med läkemedelsinducerad lupus, 95% av patienter med blandad bindvävssjukdom, 80% av patienter med Sjögrens syndrom och 90% av patienter med sklerodermia (23).

PRESTANDA

Immuno Concepts RELISA[®] ANA screeningtestsystem jämfördes med en annan ELISA antinukleär antikroppstestsats på marknaden. Den population som studerades bestod av 579 prover som överlämnades för analys av antinukleära antikroppar till ett stort universitetsmedicinskt centrum. Av dessa prover var 90 kända positiva ANA-prover, 242 prover kom från kvinnliga bloddonatorer och 261 prov från manliga bloddonatorer. Samtliga prover testades parallellt på prediktionsutrustningen och patientutrustningen. Följande data erhöles vid denna jämförelse:

	Prediktionsutrustning	
	Positivt	Negativt
IC RELISA [®] Antinukleär antikroppstest	Positivt 214	Negativt 46
	Gränsfall 12	105
	Negativt 8	787

Gränsfallresultat betraktades som positiva. Dessa data visar en total överensstämmelse på 85,4%.

Det stora antalet falskt positiva prover i Immuno Concepts test var besvärande, varför samtliga dessa sera testades för antinukleära antikroppar med Immuno Concepts HEp-2000[®] ANA-Ro-testsystem. 79 av de "falskt positiva" proverna visade sig ha klart urskiljbara ANA-mönster med den indirekta fluorescerande antikroppmetoden, och betraktades som "sant positiva" för antinukleära antikroppar. Fyra av de "falskt negativa" proverna visade sig vara negativa med den indirekta fluorescerande antikroppmetoden och betraktades som "sant negativa" för antinukleära antikroppar. Med hänsyn tagen till referensmetoden ser jämförelsen ut enligt följande:

	Referensmetod	
	Positivt	Negativt
IC RELISA [®] Antinukleär antikroppstest	Positivt 305	Negativt 72
	Negativt 4	791

Dessa data visar en total överensstämmelse på 93,5%.

REPRODUCERBARHET

Nio positiva prover, två gränsfallprover och fem negativa prover kördes vid upprepade tillfällen och av flera tekniker med antigenbelagda mikrobrunnssremor med tre olika lotnummer. Inte i något fall uppvisade ett negativt prov positiva resultat, och de positiva proverna gav genomgående klart positiva resultat. Gränsfallproverna varierade mellan negativa och gränsfall.

BIBLIOGRAFI

1. Robbins, W.C., Holman, H.R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. California Medicine 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D. Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. J. Immunol. 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. Ann. Rheum. Dis. 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. Hum. Pathol. 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. Semin. Arthritis Rheum. 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. Biol. Chem. 245:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochores) in Scleroderma Sera. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleo-protein. Ann. Rheum. Dis. 38:74-78, 1979.
14. Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease—An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). Am. J. Med. 52:148-159, 1972.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, L. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. N. Engl. J. Med. 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. J. Clin. Invest. 55:1067-1073, 1975.
17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. Arthritis Rheum. 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. J. Clin. Invest. 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. Arthritis Rheum. 19:711-719, 1976.
20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
21. Emlen, W., O'Neill, L. Clinical Significance of Antinuclear Antibodies (ANA): Comparison of Detection with Immunofluorescence and Enzyme-linked Immunosorbent Assays. Arthritis Rheum. 40:1612-1618, 1997.
22. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. Arch. Int. Med 117:620-626, 1966.
23. von Mühlen, C.A., Tan, E.M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. Semin. Arthritis Rheum. 24:323-358, 1995.

Kontakta Immuno Concepts innan du använder produkten om skyddsöpackningen är skadad.



Fabrikant



Auktoriserad Representant
europeiska unionen



Temperatur
begränsning



Innehåller tillräckligt för <n> test



Se instruktionerna



In vitro diagnostiska medicinapparat



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

RELISA® ANA TEST PROCEDUR

Alla prover, reagenser (inklusive tvättbuffertlösningen) och mikrobrunnar måste stå i rumstemperatur före användning.

- 1. IORDNINGSTÄLLANDE AV ARBETSBLAD**

Märk det arbetsblad som medföljer satsen för att ange var proverna skall stå i mikrobrunnarna. Analysera kalibratortvå gånger. En brunn används för varje reagensämne. Vi rekommenderar att varje kontroll- och patientprov analyseras två gånger tills en godtagbar precision för laboratorieprovet har fastställts.
- 2. FRAMSTÄLLNING AV TVÄTTBUFFERTLÖSNING (PBS-Tween)**

Lös upp innehållet i en PBS-buffertpåse i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. Tillsätt hela innehållet i en flaska med tvättbuffertkoncentrat i den upplösta fosfatbuffrade saltlösningen i en enlitersbehållare. Blanda väl. Tvättbuffertlösningen kan täckas och förvaras i 2-25°C i högst fyra veckor.
- 3. SPÄDNING AV PATIENTPROV**

Späd patientprov 1:40 genom att tillsätta 25 µl serum till 975 µl provspädningsvätska. Om du använder den medföljande outspädda och analyserade positiva ANA-kontrollen, skall denna spädas på samma sätt som patientproven. Blanda väl. Kalibratortvå, den positiva kontrollen och negativa kontrollen levereras färdigspädda och kräver ingen ytterligare spädning.
- 4. FÖRBERED MIKROTITERBRUNNAR**

Ta bort det begärda antalet mikrotiter strips från påsen och placera dem i ramhållaren. Mikrotiter stripen måste fästas stadigt i ramhållaren. Tryck bestämt ner i båda ändarna av stripen så de säkert fäster i ramhållaren. Vid bruk av individuella brunnar eller mindre än en hel strip med brunnar bör du vara säker på att varje brunn sitter riktigt på plats. Brunnar som är ordentligt på plats i ramhållaren trillar inte ut när ramhållaren är omvänd. Om mindre än 8 brunnar behövs för testet kan brunnen delas genom att knäppa dem itu. Oanvända brunnar kan förvaras i foliepåsen förseglad och kylt i upp till 45 dagar.
- 5. DISPENSERING AV SPÄDNINGAR**

Dispensera 100 µl av kalibratorerna, kontrollerna och de spädda patientproven i lämpliga brunnar (se arbetsblad). Dispensera 100 µl provspädningsvätska i reagensämnesbrunnen.
- 6. ODLING AV REMSOR (30 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-25°C)**

Odla i rumstemperatur i 30 minuter. Remsorna skall skyddas mot drag och temperaturväxlingar under inkubationstiden. Remsorna kan om så önskas täckas med genomskinlig tejp eller pappershandduk för att skydda dem från damm och andra främmande ämnen.
- 7. TVÄTTNING AV REMSOR (Se Allmänna proceduranvisningar 5 och 6)**

Tvätta brunnarna tre till fem gånger med PBS-Tween tvättbuffertlösning. Manuell tvätt: Aspirera brunnarnas innehåll och fyll därefter varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik korskontamination mellan brunnarna, särskilt i första tvätten efter aspirationen. Töm all tvättlösning från brunnarna genom att vända dem upp och ned och skaka därefter resterande tvättbuffert från brunnarna med en bestämd "knyck" med handleden. Upprepa fyll- och torkstegen för totalt tre till fem tvättar. Brunnarna skall sedan knackas bestämt mot en pappershandduk eller annat absorberande material för att avlägsna alla spår av resterande tvättbuffert.
- 8. DISPENSERING AV ENZYMAKROPPREAGENS**

Dispensera 100 µl enzymantikroppreagens i varje brunn.
- 9. ODLING AV REMSOR (30 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-25°C)**

Odla i rumstemperatur under trettio minuter. Remsorna skall skyddas mot drag och temperaturväxlingar under inkubationstiden. Remsorna kan om så önskas täckas med genomskinlig tejp eller pappershandduk för att skydda dem från damm och andra främmande ämnen.
- 10. TVÄTTNING AV REMSOR**

Tvätta brunnarna tre till fem gånger med PBS-Tween tvättbuffertlösning. Manuell tvätt: Aspirera brunnarnas innehåll och fyll därefter varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik korskontamination mellan brunnarna, särskilt i första tvätten efter aspirationen. Töm all tvättlösning från brunnarna genom att vända dem upp och ned och skaka därefter resterande tvättbuffert från brunnarna med en bestämd "knyck" med handleden. Upprepa fyll- och torkstegen för totalt tre till fem tvättar. Brunnarna skall sedan knackas bestämt mot en pappershandduk eller annat absorberande material för att avlägsna alla spår av resterande tvättbuffert.
- 11. DISPENSERING AV SUBSTRATLÖSNING**

Förvissa dig om jämna intervall med hjälp av ett tidur och dispensera 100 µl substratlösning i varje brunn. Substratlösningen måste tillsättas i brunnarna med jämn hastighet så att varje brunn inkuberas exakt lika länge (30 minuter). Substratlösningen i brunnar som inkuberas med positiva prover blir blå, medan lösningen i brunnar som inkuberas med negativa prover blir färglösa till mycket svagt blå.
- 12. ODLING AV REMSOR (exakt 30 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-25°C)**

Odla i rumstemperatur i exakt 30 minuter. Remsorna skall skyddas mot drag och temperaturväxlingar under inkubationstiden.
- 13. DISPENSERING AV STOPPREAGENS**

När den första brunnen har inkuberats i exakt 30 minuter, skall 100 µl stoppreagens tillsättas i varje brunn, i samma ordningsföljd och med samma hastighet som substratlösningen tillsattes i brunnarna. När stoppreagens tillsätts skiftar den blå substratlösningen till gult, medan den färglösa lösningen förblir färglös.
- 14. AVLÄSNING AV BRUNNARNAS ABSORPTION**

Brunnarna måste avläsas med plattläsande spektrofotometer inom 30 minuter efter tillsättandet av stoppreagens. Brunnarna avläses vid 450 nm mot den färglösa kontrollbrunnen. Om spektrofotometer med dubbla våglängder används skall referensfiltrets våglängd ställas in på 600-650 nm. Avläsning av mikrobrunnarna utan referensfilter ger högre absorptionsvärden.

TEKNISK SUPPORT: +1-916-363-2649
eller e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com