

## **TEST DI SCREENING DEGLI ANTICORPI ANA RELISA®**

*Per uso diagnostico in vitro*

*Per Uso Professionale*

**Numero di catalogo: 7096-11 (96 pozzetti) e 7696-11 (576 pozzetti)**

*USO PREVISTO: sistema di analisi immunoenzimatica degli anticorpi per la determinazione degli anticorpi antinucleari nel siero umano. Questo sistema di analisi deve essere usato come ausilio nella determinazione di anticorpi associati alla malattia reumatica sistemica.*

### **RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE**

Anticorpo antinucleare (ANA) è un termine generico usato per descrivere gli anticorpi contro varie nucleoproteine cellulari. I primi studi su questi anticorpi, con l'uso di tecniche di immunofluorescenza, rivelarono alcune specificità proteiche nucleari selezionate (1). A causa dell'alta correlazione dell'ANA positivo con il lupus eritematoso sistemico (SLE), un ANA negativo fu principalmente escluso dalla patologia (2).

Sebbene anticorpi specifici del DNA continuino a dimostrare un'elevata correlazione della patologia con SLE (3), è stato anche scoperto un certo numero di macromolecole nucleari (4) e citoplasmatiche (5-7) associate ad altre patologie del tessuto connettivo (8-10). Alcuni di questi anticorpi sembrano avere un significato diagnostico e/o prognostico nella sclerosi sistemica progressiva (11-12), nella patologia mista del connettivo (13-15), nella sindrome di Sjögren (16-17), nella polimiosite (18) e/o nell'artrite reumatoide (19). A causa delle associazioni tra queste patologie, il test ANA è ora riconosciuto come uno strumento di screening generale per le malattie del tessuto connettivo (20).

Il metodo più comune usato per l'analisi degli ANA è quello della immunofluorescenza indiretta (IFA) con l'uso di cellule ottenute per coltura. La sensibilità dell'analisi ANA varia a seconda del tipo di substrato usato, delle procedure di fissaggio e dei tipi di ANA presenti nei sieri. L'analisi IFA con l'uso di cellule HEp-2 o HEp-2000® è considerato un test sensibile per il rilevamento di ANA, ma è ad alto impiego di personale e soggetto ad errori derivanti dalla variabilità dei microscopi a fluorescenza e dalla interpretazione umana.

I dosaggi immunoenzimatici (EIA) sono una alternativa al metodo IFA. I sistemi di analisi EIA possono effettuare facilmente lo screening di un gran numero di campioni. Gli errori umani si riducono e i risultati sono forniti in modo oggettivo. I metodi EIA mostrano risultati falsi sia positivi che negativi in confronto ai metodi IFA (21).

### **PRINCIPIO DEL TEST**

Questa analisi è un EIA (Enzime Immunoassay, dosaggio immunoenzimatico) qualitativo indiretto. In questo sistema, la superficie dei micropozzetti è ricoperta di antigeni stabilizzati (dsDNA, istoni, SSA/Ro, SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centromero, PCNA, Ribosomal P, M2 ed altri antigeni estratti dal nucleo e citoplasma HEp-2) che fungono da substrato antigenico. Le diluizioni dei campioni del paziente sono messe nei micropozzetti ed incubate lasciando reagire gli specifici anticorpi presenti nel campione con l'antigene in fase solida. Dopo il lavaggio per rimuovere l'anticorpo non legato e le altre proteine del siero, i pozzetti sono incubati con anticorpi anti-umani di capra etichettati con perossidasi di rafano. Il preparato di anticorpo coniugato con perossidasi di rafano incluso in questo sistema di analisi è specifico per catene anti-IgG umane pesanti e leggere.

Se i risultati sono positivi, dopo l'incubazione col coniugato di perossidasi di rafano si forma un complesso stabile in tre parti. Questo complesso consiste di anticorpo anti umano coniugato con perossidasi di rafano legante l'anticorpo antinucleare umano che è legato all'antigene stabilizzato sulla superficie di plastica.

Dopo un'altra fase di lavaggio, questo complesso viene rilevato aggiungendo una soluzione di tetrametilbenzidina (TMB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> come substrato cromogenico. Il grado di viraggio del colore in ciascun pozzetto è proporzionale alla concentrazione di anticorpi antinucleari in ciascun campione di siero. Ciascun micropozzetto viene letto con uno spettrofotometro a 450 nm.

## COMPONENTI DEL SISTEMA - MATERIALI FORNITI

**Conservazione:** tutti i componenti vanno conservati alla temperatura di 2-10°C. Non congelare.

**Stabilità:** tutti i componenti restano stabili per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Non usare alcun componente oltre la data di scadenza.

### REAGENTI REATTIVI

**Strisce di micropozzetti ricoperte di antigene RELISA® **PLATE**:** numero di catalogo 7008-11. Piastra con dodici strisce da otto pozzetti ciascuna ricoperte di antigeni cellulare (dsDNA, istoni, SSA/Ro, SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centromero, PCNA, Ribosomal P, M2 ed altri antigeni estratti dal nucleo e citoplasma HEP-2). Queste strisce sono di colore prugna codificato. Se per l'analisi sono necessari meno di otto pozzetti, questi possono essere separati staccandoli. Le strisce non utilizzate possono essere rimesse nel sacchetto con essiccate provvisto di un'apposita chiusura a zip per sigillarlo e refrigerate fino a 45 giorni.

**Diluyente per campioni RELISA® **SOLN|DIL**:** numero di catalogo 7100 (100 ml). Esclusivo diluyente tamponato per campioni utilizzato per la diluizione dei campioni dei pazienti.

**Reagente enzimatico degli anticorpi RELISA® (catene anti-IgG umane pesanti e leggere) **CONJ|HRP**:** numero di catalogo 7009-11 (14 ml). Anti-IgG umane (H&L) coniugate con perossidasi di rafano (HRP). Il reagente è pronto per l'uso.

**Erogazione della soluzione substrato RELISA® **SOLN|SUB****   : numero di catalogo 7035 (14 ml). Soluzione di substrato enzimatica HRP-specifica, contenente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) stabilizzata e perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Il reagente è pronto per l'uso. **PERICOLO:** Infiammabile. Questo reagente contiene meno del 25% di metanolo e acetone. Tenere fuori dalla portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

**Erogazione del reagente bloccante RELISA® **SOLN|STOP****   : numero di catalogo 7033 (14 ml). Esclusivo reagente bloccante per sistemi di analisi EIA della Immuno Concepts. Il reagente è pronto per l'uso. **PERICOLO:** corrosivo. Questo reagente contiene acidi cloridrico e solforico (meno del 3% ciascuno in volume), e deve essere maneggiato con cura. Tenere fuori della portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente con acqua abbondante e consultare un medico. Non aggiungere mai acqua a questo reagente.

**Siero di calibrazione degli ANA RELISA® **CAL**:** numero di catalogo 7026-11 (2 ml). Siero umano che contiene anticorpi antinucleari. Il valore del dosaggio per questo siero è indicato sull'etichetta della fiala. Questo siero è alla diluizione operativa ed è pronto per l'uso.

**Controllo positivo degli ANA RELISA® **CONTROL|+**:** numero di catalogo 7021-11 (2 ml). Siero di controllo positivo umano che contiene anticorpi antinucleari. Questo siero è alla diluizione operativa ed è pronto per l'uso.

**Controllo negativo degli ANA RELISA® **CONTROL|-**:** numero di catalogo 7031 (2 ml). Siero di controllo negativo umano che non contiene anticorpi antinucleari. Questo siero è alla diluizione operativa ed è pronto per l'uso.

**Controllo positivo non diluito ANA RELISA® (opzionale) **OPT+**:** numero di catalogo 7022-11 (0,25 ml). Siero di controllo positivo umano che contiene anticorpi antinucleari. Trattare questo controllo positivo come siero non diluito.

## COMPONENTI NON REATTIVI

### Supporto per micropozzetti

#### Soluzione tampone di lavaggio:

**Tampone PBS [PWDR|PBS]:** numero di catalogo 1011. Polvere salina tamponata al fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Ciascuna busta contiene polvere tamponata sufficiente a fare 1 litro. (Nei kit per analisi completi, per ogni piastra con 96 micropozzetti sono forniti due sacchetti di polvere tamponata).

**Concentrato tampone di lavaggio [SOLN|WASH]:** numero di catalogo 1031 (10 ml). Soluzione al 5% di Tween 20 da usare nel tampone di lavaggio. (Nei kit per analisi completi, per ogni piastra con 96 micropozzetti sono fornite due fiale di concentrato tamponato).

**Preparazione:** sciogliere il contenuto di una busta di tampone in un litro di acqua deionizzata o distillata. Aggiungere l'intero contenuto di un flacone di concentrato di tampone di lavaggio al PBS sciolto. Mescolare bene e tenere alla di 2-25°C fino a 4 settimane o fino a che non si presentino segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili. Prima dell'uso, la soluzione tampone di lavaggio deve essere a temperatura ambiente (18-25°C).

## ALTRI MATERIALI NECESSARI - MA NON FORNITI

Pipette volumetriche di precisione per l'erogazione di volumi da 25-1000 µl  
Flacone morbido per erogare la soluzione tampone di lavaggio nei micropozzetti o un sistema di lavaggio automatico o semiautomatico per micropozzetti  
Contenitore da un litro per soluzione tampone di lavaggio PBS  
Acqua deionizzata o distillata  
Spettrofotometro per la lettura della piastra, capace di rilevare la misurazione dell'assorbanza a 450 nm  
Provette per preparare le diluizioni dei sieri  
Carta bibula o assorbente  
Pipettatrice multicanale in grado di erogare i volumi necessari in 8 pozzetti  
Guanti a perdere  
Timer da laboratorio

## PRECAUZIONI

1. Tutti i materiali di origine umana usati per questo prodotto sono stati analizzati e trovati negativi (non ripetutamente reattivi) per gli anticorpi del virus dell'immunodeficienza umana tipo 1 (HIV-1), del virus della immunodeficienza umana tipo 2 (HIV-2), del virus dell'epatite C (HCV) e per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) con metodi approvati dalla FDA. Nessun metodo di analisi può garantire con completa sicurezza che siano assenti HIV-1, HIV-2, epatite C, epatite B o altri agenti infettivi. Quindi, tutti i componenti del kit vanno maneggiati secondo le stesse modalità utilizzate per i materiali potenzialmente infettivi.
2. Tutti i campioni dei pazienti devono essere maneggiati osservando le precauzioni di sicurezza biologica di livello 2, come raccomandato per ogni siero umano potenzialmente infettivo o per campioni di sangue nel manuale pubblicato per i CDC/NIHM (Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, Centri per il Controllo delle Infezioni/Istituti Nazionali per la Sanità): *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La diluizione di componenti o la sostituzione di componenti diversi da quelli forniti in questo sistema può dare risultati non coerenti.
4. Il sodio azide (0,09%) viene usato come conservante. Il sodio azide può reagire nelle tubature di piombo o rame formando sali metallici di azide esplosivi. Quando si eliminano i reagenti, far scorrere grandi quantità di acqua del rubinetto per evitare la formazione di potenziali residui nelle tubature. Il sodio azide è un veleno e può essere tossico se ingerito.
5. Questo kit è per uso diagnostico *in vitro*.
6. Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la cute e le mucose. In caso di contatto, lavare abbondantemente con un sapone germicida e acqua.
7. Non fumare, non mangiare o non bere nelle aree in cui sono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
8. Evitare sempre gli spruzzi e la formazione di aerosol.
9. Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli specificati possono dare risultati errati.
10. La contaminazione incrociata dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi. Durante l'analisi i campioni devono rimanere confinati nei micropozzetti.
11. Prima dell'uso, la vetreria di laboratorio riutilizzabile deve essere lavata e sciacquata a fondo e completamente liberata da ogni residuo di detergente. Prima dell'uso, tutta la vetreria di laboratorio deve essere pulita e asciutta.
12. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti, i pozzetti e i campioni a temperatura ambiente (18-25°C).

13. Indossare guanti a perdere quando si maneggiano campioni e reagenti e dopo lavare accuratamente le mani.
14. La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
15. Il reagente bloccante è corrosivo e può causare ustioni. Questo reagente contiene acidi cloridrico e solforico (meno del 3% ciascuno in volume), e deve essere maneggiato con cura. Tenere fuori della portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente con acqua abbondante e consultare un medico. Non aggiungere mai acqua a questo reagente.

## RACCOLTA DI CAMPIONI

**Raccolta:** il siero è il campione preferito. Devono essere prelevati con tecnica asettica circa 5 ml di sangue intero per venopuntura usando una provetta di raccolta sterile a vuoto o un altro sistema di raccolta adatto. Lasciare che il sangue si coaguli a temperatura ambiente (18-25°C). Non appena possibile, il siero deve essere separato dal coagulo per centrifugazione in modo da minimizzare l'emolisi.

**Sostanze interferenti:** non vanno usati sieri che mostrano un alto grado di emolisi, ittero, lipemia o crescita microbica, perché queste condizioni possono provocare risultati atipici. Campioni contenenti sostanze particellari visibili vanno chiariti per centrifugazione prima dell'analisi.

**Conservazione:** i sieri possono essere conservati a 2-10°C fino ad una settimana. Se l'analisi viene ulteriormente rimandata, i sieri devono essere conservati congelati a -20°C o a una temperatura inferiore. Il siero non deve essere conservato in frigoriferi autosbrinatori o in freezer.

**ATTENZIONE:** il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni dei pazienti può dare origine a falsi risultati positivi o a falsi risultati negativi.

## NOTE PROCEDURALI GENERALI

1. Prima dell'uso è estremamente importante avere tutti i componenti del kit e i campioni di siero a temperatura ambiente (18-25°C). Per portare alla temperatura di 20°C un intero litro di tampone di lavaggio dopo averlo tolto dal frigo, possono essere necessarie parecchie ore. Temperature di incubazione superiori o inferiori al range stabilito possono essere causa di risultati non accurati. Dopo l'uso conservare al freddo campioni e reagenti non usati.
2. Mescolare bene i reagenti prima dell'uso capovolgendoli con delicatezza. Non far vorticare i reagenti e non scuoterli. Evitare la formazione di schiuma.
3. Quando si preparano le diluizioni dei campioni, le punte delle pipette devono essere asciugate prima di erogare il siero nel diluente per campioni. L'eccesso di campione adeso alla parte esterna della punta della pipetta influenza i risultati.
4. Si consiglia l'uso di una pipettrice multicanale perché garantisce erogazione, tempi di incubazione e tempi di reazione più uniformi.
5. **Un adeguato lavaggio dei pozzetti è estremamente importante.** Pozzetti non lavati adeguatamente mostreranno valori di fondo alti e possono dare falsi valori positivi. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, poi riempirne ciascuno con soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti, particolarmente nel primo lavaggio dopo l'aspirazione. Drenare tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e di drenaggio per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere passati con forza su carta assorbente o altro materiale assorbente in modo da eliminare ogni traccia di residuo di tampone di lavaggio. L'uso di un sistema di lavaggio automatico dei micropozzetti ne assicurerà il giusto lavaggio ed è consigliato.  
**NOTA:** a causa dei vari tipi di tecniche di lavaggio e di sistemi automatici, il numero dei lavaggi può essere adeguato in modo da ottenere risultati ottimali. Ciascun laboratorio deve decidere il numero di lavaggi più efficace per il proprio sistema di lavaggio.
6. Una inadeguata rimozione dei residui del tampone di lavaggio può causare un viraggio incoerente del colore. Per ridurre al minimo i residui di tampone di lavaggio, le strisce di micropozzetti devono essere tamponate su carta assorbente.
7. I tempi di tutte le fasi sono cruciali. Tutti i campioni di siero devono essere diluiti prima di iniziare la procedura e devono essere distribuiti nei micropozzetti nel minor tempo possibile (non più di cinque minuti). Le dimensioni dei lotti vanno fissate in modo che la manipolazione del campione possa essere realizzata comodamente entro questo lasso di tempo. L'uso di una pipetta multicanale agevola il maneggiamento dei campioni e dei reagenti ed è consigliato.
8. Con la sola eccezione dell'ultima incubazione (soluzione di substrato), ogni periodo di incubazione inizia con il completamento dell'erogazione del campione o del reagente. L'incubazione della soluzione di substrato deve durare esattamente 30 minuti per ciascun pozzetto. Tutti i campioni e i reagenti devono essere distribuiti con la stessa sequenza e a tasso costante.

# INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

## CALCOLI

1. Sottrarre il valore di assorbanza per il pozzetto bianco del reagente dai valori di assorbanza ottenuti nei pozzetti di calibrazione, di controllo e dei campioni del paziente. Calcolare i valori di assorbanza medi per i pozzetti in duplicato.
2. Per ottenere il fattore di conversione, la specifica concentrazione di anticorpi del siero di calibrazione (indicata sull'etichetta) si divide per il valore medio di assorbanza dei pozzetti di calibrazione.
3. Per ottenere la specifica concentrazione di anticorpi in unità, moltiplicare i valori di assorbanza di ciascuno dei campioni per il fattore di conversione.
4. La forma semplificata di questi calcoli può essere espressa come:

$$\frac{Uc}{\lambda c} \times \lambda s = Us$$

Uc = Valore di calibrazione (unità)

$\lambda c$  = Assorbanza del calibratore\*

$\lambda s$  = Assorbanza del campione\*

Us = Valore unitario per campione

\*Se i calibratori e i campioni sono elaborati in duplicato, usare l'assorbanza media dei pozzetti in duplicato.

## CONTROLLO DELLA QUALITÀ

1. Il valore di assorbanza medio dei pozzetti di calibrazione deve essere almeno di 0,400. Valori di assorbanza inferiori a 0,400 indicano un viraggio inadeguato del colore ed una sequenza non valida. Il viraggio inadeguato del colore in genere è dovuto all'uso di reagenti freddi o ad un tempo non esatto di una o più fasi dell'analisi. Portare i reagenti a temperatura ambiente (18-25°C), e ripetere la fase prestando particolare attenzione al tempo di tutte le fasi.
2. Il pozzetto di controllo del bianco deve avere un valore di assorbanza inferiore a 0,150. Valori di assorbanza del bianco superiori a 0,150 indicano un lavaggio inadeguato o contaminazione dei reagenti.
3. I campioni con valori di anticorpi maggiori del limite superiore del calibratore devono essere refertati come positivi e i valori verranno denominati come "maggiore di" oppure "uguale a" rispetto al valore indicato sull'etichetta del calibratore.
4. Il fattore di conversione deve essere calcolato per ogni sequenza. L'uso di un fattore di conversione di un'altra sequenza invalida i risultati.
5. Ciascun laboratorio deve stabilire e conservare i propri valori del range di riferimento (normali) sulla base del gruppo di pazienti e di altri fattori locali.
6. Il siero di controllo positivo è un siero umano che contiene anticorpi antinucleari. Questo è un controllo quantitativo che deve dare un valore maggiore di 15 unità ANA.
7. Il siero di controllo negativo è un pool di siero umano che non contiene anticorpi antinucleari. Questo controllo deve dare valori inferiori a 10 unità ANA.
8. Il siero di controllo non diluito è un siero umano che contiene anticorpi antinucleari. Questo controllo deve dare un valore superiore a 15 Unità ANA.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL PAZIENTE

Questa è un'analisi qualitativa. I livelli di anticorpi rilevati non hanno alcun significato clinico noto e i valori delle unità ottenuti in questa analisi tendono semplicemente a dividere i pazienti nei tre ampi gruppi che seguono. I pozzetti dei campioni di pazienti che hanno valori calcolati maggiori o uguali a 15 unità ANA sono considerati positivi e vanno analizzati usando un dosaggio con vetrino HEp-2 o HEp-2000<sup>®</sup> per definire gli schemi della colorazione ANA e l'appropriato test di follow-up. I pozzetti di campioni di pazienti che hanno valori calcolati inferiori a 10 unità ANA sono considerati negativi. Valori tra 10 e 15 unità sono considerati a limite (borderline) della positività e vanno ripetuti o analizzati usando un dosaggio con vetrino HEp-2 o HEp-2000<sup>®</sup> per definire gli schemi della colorazione ANA e l'appropriato test di follow-up. Ciascun laboratorio deve fissare il proprio range di riferimento e i propri valori di cut-off sulla base dei gruppi di pazienti oggetto del test. I valori delle unità sono influenzati da fattori inerenti ai pazienti, da situazioni meccaniche (come ad esempio, la precisione e l'accuratezza della pipettatura) e dalle condizioni di analisi (come ad esempio, la temperatura e il tempo delle fasi).

## RIPORTO DEI RISULTATI

I risultati devono essere riportati come positivi o negativi per anticorpi antinucleari. I valori degli anticorpi non hanno alcun significato clinico noto.

## LIMITI DEL TEST

1. Le diagnosi non possono essere fatte solo sulla base del rilevamento dell'anticorpo antinucleare. Il medico deve interpretare questi risultati confrontandoli con l'anamnesi e i sintomi del paziente, i dati fisici e altre procedure diagnostiche.
2. La cura non va iniziata sulla sola base di un test positivo per gli anticorpi antinucleari. Prima di iniziare qualunque trattamento devono essere considerate indicazioni cliniche, altri risultati di laboratorio e l'impressione clinica del medico.
3. Certi farmaci, tra cui la procainamide e la idralazina, possono indurre una patologia del tipo lupus eritematoso (22). Pazienti con LE indotta da farmaci possono mostrare ANA positivo.
4. Sebbene un ANA con titolo alto possa essere fortemente indicativo di una malattia del tessuto connettivo, ciò non deve essere considerato come diagnostico ma esaminato piuttosto come parte della complessiva storia clinica del paziente.
5. Gli ANA positivi sono osservabili anche in una piccola percentuale di pazienti con malattie infettive e/o neoplastiche (9).

## VALORI ATTESI

L'incidenza degli autoanticorpi contro i differenti antigeni nucleari varia a seconda del gruppo di pazienti e dell'incidenza clinica delle patologie reumatiche cliniche in quel gruppo. Usando la tecnica ad immunofluorescenza indiretta con cellule HEp-2, sono stati rilevati degli anticorpi antinucleari nel 95% di pazienti con lupus eritematoso sistemico, nel 90% di pazienti con lupus da farmaci, nel 95% di pazienti con malattia mista del tessuto connettivo, nell'80% di pazienti con sindrome di Sjögren e nel 90% di pazienti con sclerodermia (23).

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il sistema di test di screening degli ANA RELISA® della Immuno Concepts fu confrontato con un altro kit di analisi antinucleare ELISA reperibile in commercio. Il gruppo studiato consisteva di 579 campioni che furono presentati ad un grande centro medico universitario per analisi degli anticorpi antinucleari di cui 90 erano ben noti campioni ANA positivi, 242 campioni di donatori di sangue di sesso femminile e 261 di donatori di sangue di sesso maschile. Tutti i campioni furono testati in parallelo sul meccanismo predicato e sul meccanismo soggetto. Sulla base di questo confronto, furono ottenuti i dati che seguono:

IC Antinucleare RELISA®	Meccanismo predicato	
	Positivo	Negativo
Analisi degli anticorpi	Positivo	46
	Borderline	105
	Negativo	787

I risultati borderline vennero considerati positivi. Questi dati mostrano una concordanza complessiva dell'85,4%.

Il gran numero di campioni "positivi falsi" osservati con l'analisi della Immuno Concepts creava problemi quindi testammo tutti questi sieri per gli anticorpi antinucleari usando il sistema di analisi degli ANA-Ro HEp-2000® della Immuno Concepts. Fu dimostrato che con la tecnica ad immunofluorescenza indiretta, settantanove campioni "positivi falsi" avevano pattern ANA chiaramente distinguibili e furono considerati "positivi veri" per il rilevamento degli anticorpi antinucleari. Con la tecnica ad immunofluorescenza indiretta fu dimostrato che quattro dei campioni "negativi falsi" erano negativi e furono considerati "negativi veri" per il rilevamento degli anticorpi antinucleari. Quindi, quando si tiene conto del metodo di riferimento, il confronto appare come indicato di seguito.

IC Antinucleare RELISA®	Metodo di riferimento	
	Positivo	Negativo
Analisi degli anticorpi	Positivo	72
	Negativo	791

Questi dati mostrano una concordanza complessiva del 93,5%.

## RIPRODUCIBILITÀ

Nove campioni positivi, due campioni borderline e cinque campioni negativi furono analizzati in occasioni multiple, da parecchi tecnici, su tre diversi numeri di lotto di strisce di pozzetti ricoperti di antigene. In nessun caso un campione negativo mostrò risultati positivi e campioni positivi dettero coerentemente risultati chiaramente positivi. I campioni borderline variavano tra negativi e borderline.

## RIFERIMENTI

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 (Kinetochore) 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.

In caso di danni all'imballaggio protettivo, contattare Immuno Concepts prima dell'uso.



Fornitore



Rappresentante autorizzato  
nella Comunità Europea



Limitazione Di  
Temperatura



Contiene sufficiente per <n> test



Leggere le  
istruzioni per l'uso



Dispositivo Medico Diagnostico In vitro



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](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

Cat 7096-11-I,

4.11.02.003.102-It

Rev 7.1

© Copyright 2016

# PROCEDURA DI ANALISI ANA RELISA®

**Prima dell'uso tutti i campioni, i reagenti (compresa la soluzione tampone di lavaggio) e i micropozzetti devono essere a temperatura ambiente.**

- 1. PREPARAZIONE DEL MODULO DI PROTOCOLLO**  
Indicare nel modulo di protocollo accluso nel kit la posizione dei campioni nei micropozzetti. Analizzare il calibratore in duplicato. Un pozzetto viene usato per il bianco del reagente. Raccomandiamo di analizzare in duplicato ciascun controllo e campione del paziente, fino a che non si sia stabilita una precisione accettabile per l'analisi nel proprio laboratorio.
- 2. PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVAGGIO TAMPONE (PBS-Tween)**  
Sciogliere il contenuto di una busta di tampone PBS in un litro di acqua deionizzata o distillata. Aggiungere l'intero contenuto di un flacone di concentrato di tampone di lavaggio al contenitore di PBS sciolto. Mescolare bene. La soluzione tampone di lavaggio può essere coperta e conservata a 2-25°C fino a quattro settimane.
- 3. DILUIZIONE DEI CAMPIONI DEI PAZIENTI**  
Diluire i campioni del paziente a 1:40 aggiungendo 25 µl di siero a 975 µl di diluente per campioni. Se si usa il controllo positivo ANA non diluito opzionale, diluirlo allo stesso modo dei campioni dei pazienti. Mescolare bene. Il calibratore, il controllo positivo e il controllo negativo sono forniti alla diluizione di lavoro e non ne richiedono una ulteriore.
- 4. PREPARAZIONE DEI MICROPOZZETTI**  
Rimuovere i micropozzetti necessari dalle rispettive buste e metterli nel supporto. I micropozzetti devono essere saldamente sistemati nel supporto. Premere con forza su entrambe le estremità delle strisce in modo che stiano ben ferme nel supporto. Se si usano pozzetti singoli o meno di una striscia completa di pozzetti, assicurarsi che ogni pozzetto sia ben fermo. I pozzetti ben sistemati nel supporto non cadono quando il supporto viene capovolto. Se per l'analisi sono necessari meno di otto pozzetti, questi possono essere separati staccandoli. Le strisce non utilizzate possono essere rimesse nel sacchetto con essiccate provvisto di un'apposita chiusura a zip per sigillarlo e refrigerate fino a 45 giorni.
- 5. EROGAZIONE DELLE DILUIZIONI DEL SIERO**  
Erogare 100 µl dei calibratori, dei controlli e dei campioni diluiti dei pazienti nei pozzetti appropriati come descritto nel modulo di protocollo. Erogare 100 µl di diluente per campioni nel pozzetto bianco del reagente.
- 6. INCUBAZIONE DELLE STRISCE (30 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**  
Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Durante l'incubazione, le strisce devono essere protette da correnti d'aria o variazioni di temperatura. Le strisce possono essere eventualmente coperte con nastro trasparente o con carta assorbente per proteggerle dalla polvere o da altri corpi estranei.
- 7. LAVAGGIO DELLE STRISCE (consultare le note procedurali generali 5 e 6)**  
Lavare i pozzetti da 3 a 5 volte con soluzione di lavaggio tampone PBS-Tween. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, poi riempirne ciascuno con soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti, particolarmente nel primo lavaggio dopo l'aspirazione. Drenare tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e di drenaggio per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere passati con forza su carta assorbente o altro materiale assorbente in modo da eliminare ogni traccia di residuo di tampone di lavaggio.
- 8. EROGAZIONE DEL REAGENTE ANTICORPO ENZIMATICO**  
Erogare 100 µl di reagente anticorpo enzimatico in ciascun pozzetto.
- 9. INCUBAZIONE DELLE STRISCE (30 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**  
Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Durante l'incubazione, le strisce devono essere protette da correnti d'aria o variazioni di temperatura. Le strisce possono essere eventualmente coperte con nastro trasparente o con carta assorbente per proteggerle dalla polvere o da altri corpi estranei.
- 10. LAVAGGIO DELLE STRISCE**  
Lavare i pozzetti da 3 a 5 volte con soluzione di lavaggio tampone PBS-Tween. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, poi riempirne ciascuno con soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti, particolarmente nel primo lavaggio dopo l'aspirazione. Drenare tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e di drenaggio per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere passati con forza su carta assorbente o altro materiale assorbente in modo da eliminare ogni traccia di residuo di tampone di lavaggio.
- 11. EROGAZIONE DELLA SOLUZIONE SUBSTRATO**  
Usando un timer per assicurare intervalli coerenti, erogare 100 µl di soluzione substrato in ciascun pozzetto. La soluzione substrato deve essere aggiunta a tasso regolare in modo che ciascun pozzetto sia incubato esattamente per lo stesso tempo (30 minuti). La soluzione substrato nei pozzetti incubati con campioni positivi virerà al blu e la soluzione nei pozzetti incubati con campioni negativi sarà da incolore a blu molto chiaro.
- 12. INCUBAZIONE DELLE STRISCE (30 minuti esatti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**  
Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Durante l'incubazione, le strisce devono essere protette da correnti d'aria o variazioni di temperatura.
- 13. EROGAZIONE DEL REAGENTE BLOCCANTE**  
Dopo che il primo pozzetto è stato incubato per 30 minuti esatti, aggiungere 100 µl di reagente bloccante nello stesso ordine e allo stesso tasso con cui era stato aggiunto ai pozzetti la soluzione substrato. Al momento dell'aggiunta del reagente bloccante, la soluzione di substrato blu vira al giallo e quella incolore resta incolore.
- 14. LETTURA DELL'ASSORBANZA DEI POZZETTI**  
Entro 30 minuti dall'aggiunta del reagente bloccante, i pozzetti devono essere letti in uno spettrofotometro per la lettura della piastra. I pozzetti vengono letti a 450 nm rispetto al pozzetto di controllo del bianco. Se è disponibile uno spettrofotometro a lunghezza d'onda doppia, la lunghezza d'onda per il filtro di riferimento deve essere 600-650 nm. La lettura dei micropozzetti a 450 nm senza filtro di riferimento avrà come risultato valori di assorbanza più alti.

**PER ASSISTENZA TECNICA:** +1-916-363-2649  
oppure a mezzo e-mail: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

