

# DIASTAT<sup>®</sup> ANA

## (anti-nuclear antibody)

For professional use only  
Usage reserve aux professionnels  
Sólo para uso profesional  
Nur für den fachgebrauch  
Solo per uso professionale  
Apenas para utilização por profissionais  
Kun til professionel brug  
Endast för professionell användning



Document No. E-23-0103-08  
December, 2013

### DIASTAT<sup>®</sup> ANA

English:	page .....	2
Français:	page .....	13
Español:	página .....	24
Deutsch:	seite.....	35
Italiano:	pagina .....	46
Português:	pagina .....	57
Dansk:	side.....	68
Svenska:	sida.....	79

## **ENGLISH : INTENDED USE**

---

The DIASTAT<sup>®</sup> anti-nuclear antibody (ANA) test is a qualitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of ANAs in human serum or EDTA plasma. It detects ANAs against Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, dsDNA, histone and centromere antigens. The test may be used to screen out samples which are negative for all ANAs. Samples that give a positive test result should be further tested to identify the antigen-specific antibody or antibodies present. Quantitative/qualitative ELISA kits are available for the individual detection of Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), dsDNA and centromere ANAs. Qualitative kits are available for the individual detection of Scl-70 and Jo-1. ANA detection represents one parameter in a multicriterion diagnostic process.

## **INTRODUCTION**

---





Systemic rheumatic diseases are autoimmune disorders such as systemic lupus erythematosus and lupus variants, polymyositis, Sjögren's syndrome, scleroderma, mixed connective tissue disease, CREST and rheumatoid arthritis. A general feature of systemic rheumatic diseases is the presence of circulating antibodies to a variety of cellular antigens. The detection and serological characterisation of specific autoantibodies plays an important role in the differential diagnosis of these diseases. Autoantibodies to nuclear antigens (ANAs) are a group of antibodies specific for nuclear antigens including Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, dsDNA, histone and centromere antigens. A positive ANA test result provides presumptive evidence for systemic rheumatic disease<sup>1,2</sup>; further definition of specific antibody profiles is a valuable aid in the diagnostic process. A number of techniques are available for ANA detection including haemagglutination, immunodiffusion and indirect immunofluorescence<sup>3,4,5</sup>. These tests have inherent drawbacks - lack of sensitivity and reproducibility, and are unsuitable for large batch testing. ELISAs offer sensitivity, reproducibility, objectivity over other methods and flexibility in batch size testing. The DIASTAT<sup>®</sup> test detects total IgG and IgM antibodies to the extractable nuclear antigens Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, dsDNA, histone and centromere antigens. It also detects serum autoantibodies producing homogenous, centromere and speckled/nucleolar patterns in conventional IFA testing. The DIASTAT<sup>®</sup> ELISA is an appropriate first line screen for total antibody. A negative result reduces, but does not exclude, the likelihood of systemic rheumatic disease. Positive results should be further analysed to identify the specific autoantibodies present.

## **PRINCIPLE OF THE ASSAY**

---

The wells of the microtitre strips are coated with highly purified HEp-2 cell extract. During the first incubation, specific ANAs in diluted serum or EDTA plasma bind to the antigen-coated surface. The wells are then washed to remove unbound components. In the second incubation, the Conjugate, enzyme-labelled antibodies to human IgG and IgM, binds any surface-bound autoantibodies. After further washing, specific autoantibodies are traced by incubation with the Substrate. Addition of Stop Solution terminates the reaction, resulting in a coloured end-product. The amount of Conjugate bound is measured in absorbance units and compared with that bound by the Reference Control.

## KIT COMPONENTS

<b>A</b>	IgG/IgM Conjugate	1 × 15mL	Alkaline phosphatase-labelled antibodies to human IgG and IgM, Tris buffer, protein stabiliser, <0.1% (w/v) sodium azide. <b>Ready-to-use.</b>	
<b>B</b>	Substrate	1 × 15mL	Mg <sup>2+</sup> , phenolphthalein monophosphate (PMP), buffer solution. <b>Ready-to-use.</b> Do not expose to light during storage..	
<b>C</b>	Stop Solution	1 × 15mL	Sodium hydroxide, EDTA, carbonate buffer (pH >10). <b>Ready-to-use..</b>	
<b>D</b>	Wash Buffer Concentrate (16X)	2 × 25mL	Borate buffer, 0.4% (w/v) sodium azide. <b>Dilute before use..</b>	
<b>E</b>	HEp-2-Coated Wells and Strip Holder	12 × 8 well microtitre strips	Coated with HEp-2 cell extract, in a resealable foil pack with desiccant.	
<b>F</b>	Sample Diluent 2 Concentrate (5X)	1 × 25mL	Phosphate buffer, protein stabiliser, 5% (w/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) sodium azide. <b>Dilute before use.</b>	
<b>6</b>	ANA Reference Control	1 × 1.5mL	Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. <b>Ready-to-use.</b>	
<b>+/-</b>	Positive Control Negative Control	1 × 0.2mL 1 × 0.1mL	Human plasma, <0.1% (w/v) sodium azide. <b>Dilute 1:101 with diluted Sample Diluent 2 before use, as for samples.</b>	
	Pack Leaflet			

## STORAGE OF REAGENTS

### *Opened Kit Stability*

A kit was opened and reused on three occasions over a three month period with no adverse effect on kit performance.

### *Handling and Procedural Notes*

1. Store kit components at 2-8°C and use until the expiry date on the labels. Do not use expired reagents.
2. Do not mix different lot numbers.
3. Do not freeze kits.
4. Wash Buffer Concentrate, Sample Diluent 2 Concentrate and Positive and Negative Controls must be diluted before use. All other reagents are ready-to-use.
5. Diluted Wash Buffer and diluted Sample Diluent 2 are stable at 2-8° C for up to 6 months if microbial contamination is avoided.
6. Replace surplus microtitre strips in the foil pack and store with the desiccant at 2-8° C, until required.
7. Do not expose Substrate to light during storage.
8. Avoid contamination of reagents. Use a new disposable pipette tip for each reagent or sample manipulation.

### *Indications of Deterioration*

The Substrate should be pale yellow in colour. Pink colouring indicates contamination and the reagent must be discarded. Turbidity or precipitation in any component indicates deterioration and the component should be discarded.

### Sample Collection and Storage

The assay is recommended for serum/EDTA plasma samples; do not use lipaemic, haemolysed or turbid samples. Thoroughly mix thawed samples before assay and avoid repeated freeze/thawing. Do not heat-inactivate samples, this may yield false positive results.

Samples may be stored at or below -20° C, or assayed within 12 hours of collection.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use only.

### Safety Precautions

1. Adhere strictly to the instructions in this booklet, particularly for handling and storage conditions.
2. The Controls contain human plasma tested by FDA-cleared assays for hepatitis B surface antigen, HCV, HIV antigen and HIV antibodies and found to be non-reactive/negative. As no known test offers complete assurance that infectious agents are absent, Controls should be considered potentially infectious and handled with the same precautions as any other potentially biohazardous material. The CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3rd edition, 1993, describes how these materials should be handled in accordance with Good Laboratory Practice. This is applicable in the USA.
3. Do not pipette by mouth.
4. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where kits and samples are handled.
5. Any skin complaints, cuts, abrasions and other skin lesions should be suitably protected.
6. The Controls, Conjugate, Sample Diluent 2 Concentrate and Wash Buffer Concentrate contain sodium azide which can react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, drain with large quantities of water to prevent azide build-up.
7. The Stop Solution contains sodium hydroxide. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. Spillage should be mopped up with copious amounts of water. If contact with skin or eyes occurs, irrigate with water and seek medical attention immediately.
8. The substrate contains PMP, Bronidox L and Diethanolamine. Avoid contact with skin, eyes and respiratory system. If contact with skin, eyes or respiratory system occurs, rinse with water and seek medical advice.
9. Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Euro Diagnostica.



**Warning**

**B.**

**SUBS**

Contains: Diethanolamine

- |                 |  |
|-----------------|--|
| H319:           | Causes serious eye irritation.   |
| P264:           | Wash hands thoroughly after handling.  |
| P280:           | Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.   |
| P305+P351+P338: | IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. |
| P337+P313:      | If eye irritation persists: Get medical advice/attention.  |



C.

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

**Warning**

Contains: Sodium hydroxide

- H315: Causes skin irritation.  
 H319: Causes serious eye irritation.  
 P264: Wash hands thoroughly after handling.  
 P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.  
 P302+P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.  
 P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.  
 P332+P313: If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.  
 P337+P313: If eye irritation persists: Get medical advice/attention.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

**Warning**

Contains: Sodium azide

- H302: Harmful if swallowed.  
 EUH032: Contact with acids liberates very toxic gas.  
 H412: Harmful to aquatic life with long lasting effects.  
 P264: Wash hands thoroughly after handling.  
 P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.  
 P301+P312: IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.  
 P273: Avoid release to the environment.

## PREPARATION

### **Materials/Equipment Required but not Provided**

1. 96 well plate/strip reader with 550nm filter (540-565nm is acceptable).
2. Precision pipettes to dispense 10µL, 100µL, 1mL. Automatic pipette to dispense 100µL. Automatic pipette to dispense 200µL for manual washing, automatic plate washer optional.
3. Glass/plastic measuring cylinders: 1×100mL, 1×400mL.
4. 1mL volume containers.
5. Distilled/deionised water.
6. Paper towels.
7. Timer for 30 and 60 minute intervals.

**Preparation for the Assay**

Allow all kit components, including the microtitre strips, to warm up to 18-25° C for 30-60 minutes before use. Mix reagents by gentle inversion.

**Do not dilute the Reference Control.**

Dilute the following reagents and mix thoroughly.

Reagent	Volume	Add
Wash Buffer Concentrate	1 vial	375mL distilled/deionised water
Sample Diluent 2 Concentrate	1 vial	100mL distilled/deionised water
Positive and Negative Controls/samples	10µL	1mL diluted Sample Diluent 2

Calculate the number of microtitre strips required for the current assay, and retain these in the microtitre strip holder. Return surplus strips to the foil pack with the desiccant, and store in the resealable plastic bag at 2-8°C until required. Ensure that all strips are securely held within the microtitre strip holder, with the assay identification tab lying along the bottom edge below row H.

**ASSAY PROTOCOL**

- Reference wells for identification.
- Pipette 100µL Reference Control in duplicate, pre-diluted Positive and Negative Controls, and pre-diluted patient samples into appropriate wells. Remember to change pipette tips between additions. This step should not exceed 15 minutes for any one set of Controls/samples.
- Incubate 60±10 minutes at 18-25° C.
- Decant strip contents by quick inversion over a sink suitable for the disposal of biological materials, bearing in mind the potential infective hazard of the samples. Blot inverted strips well with paper towels.
- Wash wells **three times** with a minimum of 200µL diluted Wash Buffer. **Decant and blot after each wash step.**
- Add 100µL IgG/IgM Conjugate to each well.
- Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
- Repeat steps 4 and 5.
- Add 100µL Substrate to each well.
- Incubate 30±5 minutes at 18-25° C. **Do not decant.**
- Add 100µL Stop Solution to each well, in the same order and rate as the Substrate. Tap wells gently to mix.
- Read strips within 24 hours at 550nm (540-565nm).

## CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

**Consider each assay separately when calculating and interpreting results.**

Calculate the absorbance value (optical density) ratio for the Positive and Negative Controls, and for each sample.

$$\text{Absorbance Ratio} = \frac{\text{Sample or Control Absorbance Value}}{\text{mean Reference Control Absorbance Value}}$$

Users should calculate a cut-off between positive and negative samples that is specific to their patient populations. Results from the patient populations used in the Euro Diagnostica clinical trial suggest the following cut-off:

<u>Absorbance Ratio</u>	<u>Result Interpretation</u>
<0.7	<b>Negative</b>
≥0.7 to <1.0	<b>Borderline - recommend repeat testing on subsequent sample</b>
≥1.0	<b>Positive</b>

## QUALITY CONTROL

Ensure that adequate maintenance and calibration of the plate-reader is performed according to the manufacturer's instructions, and that the correct wavelength is employed.

Users should ensure they are fully acquainted with the instructions for the assay, particularly the Warnings and Precautions section, and the Handling and Procedural Notes. Users should demonstrate that they can obtain performance specifications for precision and reportable range of test results comparable to those established by the manufacturer before reporting patient test results. It is recommended that the pre-diluted Positive and Negative Controls are run in duplicate in all assays to monitor the quality of the test procedure. Run the ready-to-use Reference Control in duplicate in all assays.

Assuming the precision specifications described by the manufacturer are met, failure of any Control to meet the Control ratio specifications below renders the assay invalid and patient results should not be reported. The operator may repeat the assay, having reviewed their procedure, or contact the distributor/manufacturer. If repeating the assay, prepare a fresh dilution of each Control and sample. Laboratories may wish to include in-house controls in each assay run. Store such control material at or below -20° C and avoid repeat freeze/thaw cycles. Preservatives such as sodium azide at 0.1% (w/v) will not affect sample results.

Levels of analytes identified in particular diseases are those established by the manufacturer for specific populations, and may not necessarily mirror the literature. Incidence levels, their relationship to specific diseases, reference ranges, and appropriate cut-off points should all be calculated for the specific populations serviced by users.

<b>Control Ratio Specifications</b>	
$\frac{\text{Positive Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}}$	see Positive Control label
$\frac{\text{Negative Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}}$	<0.7

## EXPECTED VALUES

169 serum samples from asymptomatic apparently healthy donors with no history of autoimmune or rheumatic disease were assayed for IgG and IgM autoantibodies to nuclear antigens. This population was assembled across four European centres; results were compared against conventional immunofluorescence using HEp-2 cells as substrate. Using a cut-off ratio of 0.7, the following agreement was found.

		DIASTAT	
		+ve	-ve
IFA	+ve	1	1
	-ve	10	158

Overall agreement = 94%

### *Comparison with Immunofluorescence*

363 serum samples from patients with connective tissue disease (CTD) were compared with immunofluorescence on samples from patients with connective tissue disease at a number of European centres. Positivity or negativity on IFA was assigned according to the trial centre criteria.

		DIASTAT	
		+ve	-ve
IFA	+ve	204	32
	-ve	8	119

Sensitivity = 86%

Specificity = 94%

Overall agreement = 89%

### *Comparison with Immunofluorescence Patterns*

IFA Pattern	n	DIASTAT ANA Positive	% Agreement
Centromere	35	34	97
Nucleolar/Speckled	26	25	96
Homogenous	35	32	91
Speckled	61	53	87
Nucleolar	47	36	77



### Comparison with Immunofluorescence by Individual Autoantibodies

The assay was compared with immunofluorescence, with individual autoantibody specificities. These were determined using the specific DIASTAT<sup>®</sup> ELISA kits.

Antibody Specificity	DIASTAT Positive (ANA)	Positive (IFA)	% Agreement
Ro (SS-A)	10	10	100
La (SS-B)	6	6	100
Sm	9	9	100
Sm/RNP	20	20	100
Scl-70	38	38	100
dsDNA	15	16	94
Centromere	61	62	98
Histone	12	13	92

28 samples that were identified as Jo-1 positive using the DIASTAT<sup>®</sup> anti-Jo-1 ELISA were run in the DIASTAT<sup>®</sup> ANA kit with the following results:

24/28 (85.7%) were positive in the ANA test.

3/28 (10.7%) fell within the borderline area. Their ratios were 0.99, 0.86, and 0.78.

1/28 (3.6%) gave a ratio of 0.67.

## PERFORMANCE DATA

### Imprecision

- Intra-assay imprecision** determined by testing three controls in three assays, using three operators and three kit batches, with replication of eight.

Control	Absorbance Value	SD	%CV
1	0.771	0.026	3.4
2	1.102	0.031	2.8
3	1.136	0.055	4.8

- Inter-assay imprecision** determined by testing six controls in 20 assays, using three operators and eight kit batches, with replication of four.

Control	Absorbance Value	SD	%CV
1	0.219	0.031	14.2
2	0.273	0.031	11.4
3	0.365	0.036	9.9
4	0.521	0.036	6.9
5	1.078	0.130	12.1
6	1.012	0.131	12.9

## LIMITATIONS OF USE

---

1. Although the presence of high titres of autoantibodies to nuclear antigens is indicative of systemic rheumatic diseases, the data must be considered in light of other clinical and laboratory findings.
2. Some individuals may have raised levels of ANAs with little or no evidence of clinical disease. By contrast, some patients with evidence of clinical disease may have undetectable levels of these antibodies.
3. The test does not identify the ANA antibody specificity. If a sample gives a positive result then further tests should be carried out to determine autoantibody specificity.
4. For repeat patient sampling, e.g. for monitoring, the same type of sample (serum or EDTA plasma) should be used throughout the study period.

## REFERENCES






---

1. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Disease and Probes for Cell Biology. *Advances in Immunology*, **44**, 93-151, 1982.
2. Nakamura RM, Tan EM. Recent Advances in Laboratory Tests and the Significance of Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases. *Clinics in Laboratory Medicine*, **6**, 41-53, 1986.
3. Sharp GC, Irvin WS, et al. Association of Autoantibodies to Different Nuclear Antigens with Clinical Patterns of Rheumatic Disease and Responsiveness to Therapy. *J Clin Invest*, **50**, 350-359, 1971.
4. Friou GJ. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Significance and Methods. *Arthritis Rheum*, **10**, 151-159, 1967.
5. Eds. Nakamura RM, Greenwald CA, et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Advances in Laboratory Tests and Significance in Systemic Rheumatic Diseases. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1978.

## SUMMARY OF PROTOCOL

---





1. Dilute samples and Positive and Negative Controls 1:101. Do not dilute Reference Control.
2. Add 100µL of Reference Control in duplicate, pre-diluted Positive and Negative Controls and samples into referenced wells of the microtitre strip.
3. Incubate 60±10 minutes at 18-25° C.
4. Wash strips 3 times.
5. Add 100µL of IgG/IgM Conjugate to each well.
6. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
7. Wash strips 3 times.
8. Add 100µL of Substrate to each well.
9. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
10. Add 100µL of Stop Solution to each well.
11. Read absorbance at 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Código do lote / Lotnummer / Satsnummer
	Catalogue number / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Referência de catálogo / Bestillingsnummer / Katalognummer
	Use by / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Prazo de validade / Skal anvendes inden / Hållbar till
	Temperature limitation / Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura / Limites de temperatura / Opbevares ved / Temperaturgrænser
	Biological risks / Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung / /Rischio biologico / Risco biológico / Biologiske risici / Biologisk risk
	Consult instructions for use / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte as instruções de utilização / Læs brugsvejledning / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik / In vitro diagnostika
	Manufacturer / Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Fabricante Producent / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Contém o suficiente para "n" testes / Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Atenção / Advarsel / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro / Conformidade com In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC, Diretiva de Dispositivos Médicos / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

<b>CONJ</b>	Conjugate / Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Conjugado / Konjugat Konjugat
<b>SUBS</b>	Substrate / Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrato / Substrat / Substrat
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution / Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung / Soluzione bloccante / Solução de paragem / Stopopløsning / Stopplösning
<b>BUF WASH 16 x</b>	Wash buffer concentrate (16 X) / Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tampão de lavagem concentrado (16 X) / Vaskebufferkoncentrat (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
<b>Ag</b>	Hep-2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Hep-2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con HEp-2 / Hep-2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Hep-2 e supporto per strip / Poços revestidos com HEp-2 e suporte de tiras / Hep-2-coatede brønde og strip- holder / Hep-2-klädda brunnar och striphållare
<b>DIL SPE 5 X</b>	Sample Diluent 2 Concentrate (5 X) / Concentré 2 diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluyente 2 de Muestra (5 X) / Probediluens 2-Konzentrat / Diluyente per campioni 2 concentrato (5 X) / Diluente de Amostras 2 concentrado (5 X) / Prøvediluent 2-koncentrat (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
<b>CONTROL REF</b>	ANA Reference Control / Témoin de référence ANA / Control de Referencia ANA / ANA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento ANA / Controllo de referência de ANAs / ANA Referencekontrol / ANA referenskontroll
<b>CONTROL +</b>	Positive Controls / Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Controlos Positivos / Positive kontrollen / Positiva kontrollen
<b>CONTROL -</b>	Negative Controls / Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Controlos Negativos / Negative kontrollen / Negativa kontrollen



## CONSTITUANTS DU NECESSAIRE

<b>A</b>	Conjugué IgG/IgM	1 x 15mL	Anticorps marqués à l'alcaline- phosphatase, et dirigés contre l'IgG et l'IgM humaines, tampon Tris, stabilisateur des protéines, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). <b>Prêt à l'emploi.</b>	
<b>B</b>	Substrat	1 x 15mL	Mg <sup>2+</sup> , monophosphate de phénolphtaléine (MPP), solution tampon. <b>Prêt à l'emploi.</b> Ne pas exposer à la lumière pendant la conservation..	
<b>C</b>	Solution d'Arrêt	1 x 15mL	Hydroxyde de sodium, EDTA, tampon carbonate (pH >10). <b>Prêt à l'emploi.</b>	
<b>D</b>	Concentré tampon de lavage (16X)	2 x 25mL	Tampon borate, azoture de sodium à 0,4 % (p/v). <b>Diluer avant l'usage.</b>	
<b>E</b>	Cupules enduites de HEp-2 et Porte-bandes	12 bandes de microtitrage à 8 cupules	Enduites d'extrait cellulaire HEp-2, conditionnées dans une poche en aluminium refermable, contenant du desséchant.	
<b>F</b>	Concentré de diluant 2 pour échantillons(5X)	1 x 25mL	Tampon phosphate, stabilisateur de protéines, Triton à 5 % (p/v) X-100, azoture de sodium à 0,5 % (p/v). <b>Diluer avant l'usage.</b>	
<b>6</b>	Témoin de référence AAN	1 x 1,5mL	Plasma humain, tampon, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). <b>Prêt à l'emploi.</b>	
<b>+/-</b>	Témoin positif Témoin négatif	1 x 0,2mL 1 x 0,1mL	Plasma humain, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). <b>Diluer à raison de 1:101 avec du Diluant 2 dilué pour échantillons avant l'usage, comme pour les échantillons.</b>	
	Notice incluse dans le conditionnement			

## CONSERVATION DES REACTIFS

### **Stabilité des produits du nécessaire ouvert**

Un nécessaire a été ouvert et réutilisé à trois reprises sur une période de trois mois et cela n'a eu aucun effet néfaste sur sa performance.

### **Remarques relatives à la manipulation et à la méthode à suivre**

1. Conserver les constituants du nécessaire à 2-8° C et utiliser jusqu'à la date de péremption marquée sur les étiquettes. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
2. Ne pas mélanger des numéros de lots différents.
3. Ne pas congeler les nécessaires.
4. Le Concentré tampon de lavage, le Concentré diluant 2 pour échantillons et les témoins positifs et négatifs doivent être dilués avant l'usage. Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.
5. Le Tampon de lavage dilué et le Diluant 2 dilué pour échantillons restent stables à 2-8° C pendant un maximum de 6 mois si l'on évite toute contamination microbienne.
6. Remettre les bandes de microtitrage non utilisées dans la poche d'aluminium contenant du desséchant, et conserver à 2-8° C, jusqu'à ce que l'on en est besoin.
7. Ne pas exposer le Substrat à la lumière durant la conservation.
8. Eviter la contamination des réactifs. Utiliser un nouvel embout de pipette à jeter pour chaque réactif ou chaque manipulation des échantillons.

### **Indications d'une détérioration**

Le Substrat doit être d'une couleur jaune pâle. Une couleur rose indique qu'il y a eu contamination et le réactif doit alors être jeté. Un trouble ou une précipitation dans n'importe quel constituant indique qu'il y a eu détérioration et le constituant doit être jeté.

### **Prélèvement et conservation des échantillons**

Le dosage est recommandé pour les échantillons de sérum/plasma EDTA; ne pas utiliser d'échantillons lipémiques, hémolysés ou troubles. Bien mélanger les échantillons dégelés avant de les analyser et éviter les cycles fréquents de congélation/décongélation. Ne pas inactiver les échantillons par la chaleur car cela pourrait donner des résultats faussement positifs.

Les échantillons peuvent être conservés à une température -20° C, ou analysés dans les 12 heures suivant leur prélèvement.

## **MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS**

### **Réservé à l'usage diagnostique in vitro.**

#### **Précautions de sécurité**

1. Suivre scrupuleusement les instructions données dans ce dépliant, surtout en ce qui concerne la manipulation et les conditions de conservation.
2. Les témoins contiennent du plasma humain testés avec des dosages approuvés par la FDA pour détecter la présence éventuelle de l'antigène de surface de l'hépatite B, du virus HCV, de l'antigène anti-VIH et d'anticorps anti-VIH, auxquels ils ont obtenu des résultats non réactifs/négatifs. Etant donné qu'il n'existe aucun test qui puisse garantir l'absence d'agents infectieux à 100 %, agir comme si les Témoins étaient potentiellement infectieux et les manipuler en prenant les mêmes précautions qu'avec toute autre substance pouvant être biologiquement dangereuse. Le Manuel de Santé du Centre épidémiologique/des Instituts nationaux de la santé (CDC/NIH), intitulé "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3ème édition, 1993, décrit la manière de manipuler de telles substances conformément aux bonnes pratiques de laboratoire. Cela est applicable aux Etats-Unis.
3. Ne pas aspirer les produits avec une pipette.
4. Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller dans les zones de manipulation des nécessaires et des échantillons.
5. Protéger toute éruption cutané, coupure, abrasion et autre lésion cutanée de manière adéquate.
6. Les Témoins, le Conjugué, le Concentré diluant 2 pour échantillons et le Concentré tampon de lavage contiennent de l'azoture de sodium qui peut réagir avec des tuyaux en plomb et en cuivre pour former des azotures métalliques très explosifs. Lors de l'élimination, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter toute accumulation d'azoture.
7. La Solution d'arrêt contient de l'hydroxyde de sodium. Eviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses. Disperser tout déversement avec de grandes quantités d'eau. En cas de contact avec la peau ou les yeux, irriguer avec de l'eau et consulter immédiatement un médecin.
8. Le substrat contient du PMP, du Bronidox L et de la diéthanolamine. Éviter tout contact avec la peau, les yeux ou les voies respiratoires. En cas de contact avec la peau, les yeux ou les voies respiratoires, laver avec de l'eau et consulter un médecin.
9. On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le nécessaire sur demande auprès de Euro Diagnostica.

**B.**



**Attention**

SUBS

Contient: Diéthanolamine

H319:	Provoque une sévère irritation des yeux.
P264:	Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P280:	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P305+P351+P338:	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P337+P313:	Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

**Attention****C.**

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

Contient: Hydroxyde de sodium

H315:	Provoque une irritation cutanée.
H319:	Provoque une sévère irritation des yeux.
P264:	Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P280:	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P302+P352:	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
P305+P351+P338:	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P332+P313:	En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.
P337+P313:	Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

**Attention****D. and F.**

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Contient: Azoture de sodium

H302:	Nocif en cas d'ingestion.
EUH032:	Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.
H412:	Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
P264:	Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P280:	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P301+P312:	EN CAS D'INGESTION: appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.
P273:	Éviter le rejet dans l'environnement.

## PREPARATION

### ***Substances/Équipement requis mais non inclus dans le nécessaire***

1. Lecteur de plaque/bande à 96 cupules, avec filtre de 550nm (540-565nm est acceptable).
2. Pipettes de précision pour distribuer 10µL, 100µL, 1mL. Pipette automatique pour distribuer 100µL. Pipette automatique pour distribuer 200µL pour le lavage à la main, laveur de plaques automatique (facultatif).
3. Eprouvettes à pied graduées en verre/matière plastique: 1x100 mL, 1x400 mL.
4. Récipients contenant 1mL .
5. Eau distillée/désionisée.
6. Serviettes en papier.
7. Minuterie pour intervalles de 30 et 60 minutes.



**Préparation pour le dosage**

Attendre 30 à 60 minutes pour que tous les constituants du nécessaire, y compris les bandes de microtitrage, soient à la température de 18-25° C avant de les utiliser. Mélanger les réactifs en renversant doucement les récipients.

**Ne pas diluer le Témoin de référence.**

Diluer les réactifs suivants et bien mélanger.

Réactif	Volume	Ajouter
Concentré tampon de lavage	1 flacon	375mL d'eau distillée/désionisée
Concentré diluant 2 pour échantillons	1 flacon	100mL d'eau distillée/désionisée
Témoins positifs et négatifs/échantillons	10 µL	1mL de Diluant 2 dilué pour échantillons

Calculer le nombre de bandes de microtitrage requises pour le dosage en cours, et les placer dans le porte-bandes de microtitrage. Remettre les bandes non utilisées dans la poche en aluminium avec le desséchant, et conserver dans la poche en plastique refermable à 2-8° C jusqu'à ce que l'on en ait besoin. S'assurer que toutes les bandes ne risquent pas de tomber du porte-bandes de microtitrage, la languette d'identification du dosage étant couchée le long de la bordure inférieure, juste en-dessous de la rangée H.

## P R O T O C O L E   D U   D O S A G E

1. Annoter les cupules afin de pouvoir les identifier.
2. Avec une pipette, prélever 100µL du témoin de référence, en double exemplaire, des témoins positifs et négatifs prédilués, et des échantillons du patient prédilués, puis déposer dans les cupules appropriées. Ne pas oublier de changer d'embout de pipette pour chaque addition. Cette étape ne devrait pas prendre plus de 15 minutes pour n'importe quelle série de témoins/échantillons.
3. Faire incuber pendant 60 ± 10 minutes à 18-25° C.
4. Décanter le contenu des bandes par renversement rapide au-dessus d'un évier convenant à l'élimination de substances biologiques, en n'oubliant pas que les échantillons sont potentiellement infectieux. Bien éponger les bandes renversées avec des serviettes en papier.
5. Laver les cupules **trois fois** avec un minimum de 200µL de Tampon de lavage dilué. **Décanter et éponger après chaque étape du lavage.**
6. Ajouter 100µL de Conjugué IgG/IgM dans chaque cupule.
7. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25° C.
8. Répéter les étapes 4 et 5.
9. Ajouter 100µL de Substrat à chaque cupule.
10. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25° C. **Ne pas décanter.**
11. Ajouter 100µL de Solution d'arrêt dans chaque cupule, dans le même ordre et avec la même vitesse que le Substrat. Tapoter doucement les cupules pour mélanger.
12. Lire le résultat obtenu des bandes en l'espace de 24 heures et à 550nm (540-565nm).

## CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

**Considérer chaque dosage séparément lors du calcul et de l'interprétation des résultats.** Calculer le coefficient d'absorption (densité optique) pour les Témoins positifs et négatifs, et pour chaque échantillon.

$$\text{Coefficient d'absorption} = \frac{\text{Valeur d'absorption de l'échantillon ou du Témoin}}{\text{Valeur d'absorption moyenne du Témoin de référence}}$$

Les utilisateurs doivent calculer une valeur seuil entre les échantillons positifs et négatifs qui est spécifique à leurs populations de patients. Les résultats des populations de patients utilisées dans l'essai clinique Euro Diagnostica suggèrent la valeur seuil suivante:

<b><u>Coefficient d'absorption</u></b>	<b><u>Interprétation des résultats</u></b>
<0,7	Négatif
≥0,7 à <1,0	Valeur seuil - il est recommandé de refaire le test sur l'échantillon ultérieur
≥1,0	Positif

## CONTROLE DE LA QUALITE

S'assurer qu'un entretien et un étalonnage adéquats du lecteur de plaques ont été effectués, conformément aux instructions du fabricant, et que la longueur d'onde utilisée est correcte. Les utilisateurs doivent s'assurer qu'ils ont bien pris connaissance des instructions pour effectuer le dosage, et en particulier de la Sections sur les Mises en garde et Précautions, et des Remarques relatives à la Manipulation et à la Méthode à suivre. Les utilisateurs doivent prouver qu'ils peuvent obtenir des spécifications de la performance pour la précision, et des limites rapportables de résultats des tests comparables à celles fixées par le fabricant avant de signaler les résultats des tests des patients. Il est recommandé que les témoins positifs et négatifs prédilués soient analysés en double exemplaire dans tous les dosages afin de contrôler la qualité de la méthode de test. Analyser le Témoin de référence prêt à l'emploi en double exemplaire dans tous les dosages.

Dans la mesure où les spécifications relatives à la précision décrites par le fabricant sont satisfaites, si un Témoin quelconque ne satisfait pas les spécifications du coefficient des Témoins indiquées ci-dessous, le dosage devient invalide et les résultats obtenus du patient ne doivent pas être communiqués. L'opérateur peut répéter le dosage, après avoir réexaminé la méthode à suivre, ou bien se mettre en contact avec le distributeur/fabricant. Si le dosage est renouvelé, préparer une solution fraîche de chaque Témoin et de chaque échantillon. Il se peut que les laboratoires désirent effectuer des contrôles internes durant chaque analyse. Conserver une telle substance témoin à une température -20° C, et éviter les cycles répétitifs de congélation/décongélation. Les agents de conservation tels que l'azoture de sodium n'affecteront pas les résultats obtenus avec les échantillons.

Les taux d'analytes identifiés dans des affections particulières sont ceux établis par le fabricant pour des populations spécifiques, et ils ne reflèteront pas automatiquement ceux mentionnés dans la documentation. Les incidences, leur lien avec des affections spécifiques, les limites de référence, et les points d'arrêt appropriés doivent tous être calculés pour les populations spécifiques servies par les utilisateurs.

<b><i>Spécifications des coefficients des Témoins</i></b>	
$\frac{\text{Absorption du Témoin positif}}{\text{Absorption du Témoin de référence}}$	voir étiquette du Témoin positif
$\frac{\text{Absorption du Témoin négatif}}{\text{Absorption du Témoin de référence}}$	<0,7

## VALEURS ATTENDUES

169 échantillons sériques provenant de donneurs apparemment en bonne santé et asymptomatiques, sans antécédents d'affection auto-immune ou rhumatismale, ont été analysés pour détecter la présence d'auto-anticorps IgG et IgM dirigés contre les antigènes nucléaires. Cette population avait été rassemblée dans quatre centres européens ; les résultats ont été comparés à ceux obtenus par immunofluorescence conventionnelle utilisant des cellules HEp-2 comme substrat. En utilisant un coefficient seuil de 0,7, la concordance suivante a été obtenue.

		DIASTAT <sup>®</sup>	
		+ve	-ve
IFA	+ve	1	1
	-ve	10	158

Concordance générale = 94%

### *Comparaison avec l'Immunofluorescence*

363 échantillons sériques provenant de patients avec une connectivité mixte (CM) ont été comparés avec l'immunofluorescence avec des échantillons provenant de patients avec connectivité mixte dans un certain nombre de centres européens. La positivité ou négativité de l'immunofluorescence indirecte (IFA) a été attribuée en fonction des critères adoptés par le centre d'essai.

		DIASTAT <sup>®</sup>	
		+ve	-ve
IFA	+ve	204	32
	-ve	8	119

Sensibilité = 86%

Spécificité = 94%

Concordance générale = 89%

### *Comparaison avec les profils de l'Immunofluorescence (IFA)*

Profils d'IFA	n	AAN DIASTAT Positif	% de concordance
Centromères	35	34	97
Nucléolaires/Mouchetés	26	25	96
Homogènes	35	32	91
Mouchetés	61	53	87
Nucléolaires	47	36	77

**Comparaison avec l' Immunofluorescence par Auto-anticorps individuels**

Le dosage a été comparé avec l'immunofluorescence, avec spécificités d'auto-anticorps individuels. Celles-ci ont été déterminées en utilisant les nécessaires spécifiques ELISA DIASTAT®.

Spécificité d'anticorps	DIASTAT Positif (AAN)	Positif (IFA)	% de concordance
Ro (SS-A)	10	10	100
La (SS-B)	6	6	100
Sm	9	9	100
Sm/RNP	20	20	100
Scl-70	38	38	100
dsDNA	15	16	94
Centromères	61	62	98
Histones	12	13	92

28 échantillons qui ont été identifiés comme Jo-1-positifs avec le test ELISA DIASTAT® anti-Jo-1 ont été analysés avec le nécessaire AAN DIASTAT® et les résultats suivants ont été obtenus :

24/28 (85,7%) étaient positifs dans le test AAN.

3/28 (10,7%) ont obtenu des valeurs proches de la valeur seuil. Leurs coefficients étaient de 0,99, 0,86 et 0,78.

1/28 (3,6%) ont donné un coefficient de 0,67.

**DONNEES RELATIVES A LA PERFORMANCE****Imprécision**

- Imprécision intra-dosages** déterminée en testant trois témoins dans trois dosages, en utilisant trois laborantins et trois lots de nécessaires, avec réplication de huit.

Témoin	Valeur d'absorption	ET	%CV
1	0,771	0,026	3,4
2	1,102	0,031	2,8
3	1,136	0,055	4,8

- Imprécision inter-dosages** déterminée en testant six témoins dans 20 dosages, en utilisant trois laborantins et huit lots de nécessaires, avec réplication de quatre.

Témoin	Valeur d'absorption	ET	%CV
1	0,219	0,031	14,2
2	0,273	0,031	11,4
3	0,365	0,036	9,9
4	0,521	0,036	6,9
5	1,078	0,130	12,1
6	1,012	0,131	12,9

---

## RESTRICTIONS D'UTILISATION

---

1. Bien que la présence de taux élevés d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes nucléaires indique la présence d'une affection rhumatismale générale, les données doivent être considérées en tenant compte des autres résultats cliniques et biologiques.
2. Chez certains individus, il peut y avoir des taux élevés d'AAN mais peu ou pas de preuves d'une affection clinique. Par contre, il se peut que des patients atteints d'une affection clinique aient des taux indétectables de ces anticorps.
3. Le test n'identifie pas la spécificité d'anticorps AAN. Si un échantillon donne un résultat positif, il faut alors faire d'autres tests pour déterminer la spécificité d'auto-anticorps.
4. Pour des échantillonnages répétitifs chez un patient, par ex. à des fins de monitoring, le même type d'échantillon (sérum ou plasma EDTA) doit être utilisé durant toute la période d'étude.

---

## REFERENCES

---


1. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Disease and Probes for Cell Biology. *Advances in Immunology*, **44**, 93-151, 1982.
2. Nakamura RM, Tan EM. Recent Advances in Laboratory Tests and the Significance of Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases. *Clinics in Laboratory Medicine*, **6**, 41-53, 1986.
3. Sharp GC, Irvin WS, et al. Association of Autoantibodies to Different Nuclear Antigens with Clinical Patterns of Rheumatic Disease and Responsiveness to Therapy. *J Clin Invest*, **50**, 350-359, 1971.
4. Friou GJ. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Significance and Methods. *Arthritis Rheum*, **10**, 151-159, 1967.
5. Eds. Nakamura RM, Greenwald CA, et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Advances in Laboratory Tests and Significance in Systemic Rheumatic Diseases. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1978.

---

## RESUME DU PROTOCOLE

---

1. Diluer les échantillons et les Témoins positifs et négatifs à raison de 1:101. Ne pas diluer le Témoin de référence.
2. Ajouter 100µL de Témoin de référence en double exemplaire, des Témoins positifs et négatifs prédilués et des échantillons dans les cupules référencées de la bande de microtitrage.
3. Faire incuber pendant  $60 \pm 10$  minutes à 18-25° C.
4. Laver les bandes 3 fois.
5. Ajouter 100µL de Conjugué IgG/IgM dans chaque cupule.
6. Faire incuber pendant  $30 \pm 5$  minutes à 18-25° C.
7. Laver les bandes 3 fois.
8. Ajouter 100µL de Substrat dans chaque cupule.
9. Faire incuber pendant  $30 \pm 5$  minutes à 18-25° C.
10. Ajouter 100µL de Solution d'arrêt dans chaque cupule.
11. Lire la capacité d'absorption à 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Código do lote / Lotnummer / Satsnummer
	Catalogue number / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Referência de catálogo / Bestillingsnummer / Katalognummer
	Use by / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Prazo de validade / Skal anvendes inden / Hållbar till
	Temperature limitation / Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura / Limites de temperatura / Opbevares ved / Temperaturgrænser
	Biological risks / Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung / /Rischio biologico / Risco biológico / Biologiske risici / Biologisk risk
	Consult instructions for use / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte as instruções de utilização / Læs brugsvejledning / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik / In vitro diagnostika
	Manufacturer / Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Fabricante Producent / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Contém o suficiente para "n" testes / Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Atenção / Advarsel / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro / Conformidade com In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC, Diretiva de Dispositivos Médicos / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

<b>CONJ</b>	Conjugate / Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Conjugado / Konjugat Konjugat
<b>SUBS</b>	Substrate / Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrato / Substrat / Substrat
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution / Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung / Soluzione bloccante / Solução de paragem / Stopopløsning / Stopplösning
<b>BUF WASH 16 x</b>	Wash buffer concentrate (16 X) / Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tampão de lavagem concentrado (16 X) / Vaskebufferkoncentrat (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
<b>Ag</b>	Hep-2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Hep-2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con HEp-2 / Hep-2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Hep-2 e supporto per strip / Poços revestidos com HEp-2 e suporte de tiras / Hep-2-coatede brønde og strip- holder / Hep-2-klädda brunnar och striphållare
<b>DIL SPE 5 X</b>	Sample Diluent 2 Concentrate (5 X) / Concentré 2 diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluyente 2 de Muestra (5 X) / Probediluens 2-Konzentrat / Diluyente per campioni 2 concentrato (5 X) / Diluyente de Amostras 2 concentrado (5 X) / Prøvediluent 2-koncentrat (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
<b>CONTROL REF</b>	ANA Reference Control / Témoin de référence ANA / Control de Referencia ANA / ANA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento ANA / Controllo de referência de ANAs / ANA Referencekontrol / ANA referenskontroll
<b>CONTROL +</b>	Positive Controls / Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Controlos Positivos / Positive kontrollen / Positiva kontrollen
<b>CONTROL -</b>	Negative Controls / Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Controlos Negativos / Negative kontrollen / Negativa kontrollen

## ESPAÑOL: USO PREVISTO

La prueba de anticuerpos antinucleares (ANA) DIASTAT® es un análisis inmunosorbente con anticuerpo ligado a enzima (ELISA) para la detección de ANAs en plasma EDTA o suero humano. Detecta ANAs contra antígenos de centrómero, histona, Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1 y dsDNA. Se puede utilizar esta prueba para descartar mediante screening las muestras que son negativas para todos los ANAs. Se debe realizar otra prueba a las muestras que hayan dado un resultado positivo con el fin de identificar qué anticuerpo o anticuerpos específicos al antígeno están presentes. Están disponibles kits ELISA cuantitativos/cualitativos para la detección individual de ANAs de centrómero, Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B) y dsDNA. Están disponibles kits cualitativos para la detección individual de Scl-70 y Jo-1. La detección de ANAs representa un parámetro de un proceso diagnóstico de múltiples criterios.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades reumáticas sistémicas son trastornos autoinmunes, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico y variantes del lupus, polimiositis, síndrome de Sjögren, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, CREST y artritis reumatoidea. Una característica general de las enfermedades reumáticas sistémicas es la presencia de anticuerpos circulantes a diversos antígenos celulares. La detección y la caracterización serológica de autoanticuerpos específicos desempeña un papel importante en el diagnóstico diferencial de estas enfermedades.

Los autoanticuerpos a antígenos nucleares (ANAs) son un grupo de anticuerpos específicos para antígenos nucleares, incluidos los antígenos de centrómero, histona, Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1 y dsDNA. Un resultado positivo en la prueba ANA proporciona evidencias que presumen una enfermedad reumática sistémica<sup>1,2</sup>; la definición de perfiles de anticuerpos específicos constituye una ayuda valiosa en el proceso diagnóstico. Están disponibles diversas técnicas para la detección de ANA, entre las que se incluyen la hemaglutinación, la inmunodifusión y la inmunofluorescencia indirecta<sup>3,4,5</sup>. Estas pruebas presentan inconvenientes inherentes a las mismas (falta de sensibilidad y reproductibilidad) y no son adecuadas para las pruebas de un gran volumen de lotes. Los ELISAs ofrecen sensibilidad, reproductibilidad, objetividad en relación con otros métodos y flexibilidad en el volumen de los lotes de las pruebas.





La prueba DIASTAT® detecta el total de anticuerpos IgG e IgM a los antígenos nucleares extraíbles Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, dsDNA, y a los antígenos de centrómero e histona. También detecta autoanticuerpos en suero que producen modelos homogéneos, de centrómero y moteados/nucleolares en las pruebas IFA convencionales. El ELISA DIASTAT® constituye un screening de primera línea apropiado para los anticuerpos totales. Un resultado negativo reduce, pero no excluye, la probabilidad de enfermedad reumática sistémica. Los resultados positivos deben ser posteriormente analizados para identificar los autoanticuerpos específicos presentes.

## PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS

Los vasos de las bandas de microtitulación se recubren con extracto de células HEp-2 altamente purificado. Durante la primera incubación, los ANAs específicos en suero diluido o plasma EDTA se fijan a la superficie recubierta con antígeno. A continuación, se lavan los vasos para eliminar los componentes no fijados. En la segunda incubación, el Conjugado, anticuerpos marcados con enzima a IgG e IgM humanas, se fija a cualquier autoanticuerpo fijado a la superficie. Después de otro lavado, se determinan los autoanticuerpos específicos mediante la incubación con el Substrato. El añadido de la Solución de Parada finaliza la reacción, produciendo un producto final coloreado. La cantidad de Conjugado fijado se mide en unidades de absorbencia y se compara con la fijada por el Control de Referencia.



## COMPONENTES DEL KIT

<b>A</b>	Conjugado IgG/IgM	1 x 15mL	Anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina a IgG e IgM humanas, búfer Tris, estabilizador de proteínas, <0,1% (c/v) azida sódica. <b>Listo para su uso.</b>	
<b>B</b>	Substrato	1 x 15mL	Mg <sup>2+</sup> , monofosfato de fenoltaleína (PMP), solución de búfer. <b>Listo para su uso.</b> No exponer a la luz durante el almacenamiento.	
<b>C</b>	Solución de Parada	1 x 15mL	Hidróxido de sodio, EDTA, búfer carbonatado (pH >10). <b>Listo para su uso.</b>	
<b>D</b>	Concentrado de Búfer de Lavado (16X)	2 x 25mL	Búfer boratado, 0,4% (c/v) azida sódica. <b>Diluir antes de usar.</b>	
<b>E</b>	Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con HEp-2	12 x 8 bandas de microtitulación de vasos	Recubierto con extracto de células HEp-2, en un paquete metalizado y resellable con desecante.	
<b>F</b>	Concentrado de Diluyente de Muestra 2 (5X)	1 x 25mL	Búfer fosfatado, estabilizador de proteínas, 5% (c/v) Triton X-100, 0,5% (c/v) azida sódica. <b>Diluir antes de usar.</b>	
<b>6</b>	Control de Referencia ANA	1 x 1,5mL	Plasma humano, búfer, <0,1% (c/v) azida sódica. <b>Listo para su uso.</b>	
<b>+/-</b>	Control Positivo Control Negativo	1 x 0,2 mL 1 x 0,1 mL	Plasma humano, <0,1% (c/v) azida sódica. <b>Diluir 1:101 con Diluyente de Muestra 2 diluido antes de su utilización, en lo que se refiere a las muestras.</b>	
	Folleto del Paquete			

## ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

### *Estabilidad del Kit Una Vez Abierto*

Un kit fue abierto y reutilizado en tres ocasiones durante un período de tres meses sin efectos adversos sobre su eficacia.

### *Notas sobre la Manipulación y los Procedimientos*

1. Guardar los componentes del kit a 2-8° C y utilizar hasta la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas. No utilizar reactivos caducados.
2. No mezclar números de lote diferentes.
3. No congelar los kits.
4. El Concentrado de Búfer de Lavado, el Concentrado de Diluyente de Muestra 2 y los Controles Positivos y Negativos deben diluirse antes de su utilización. Todo el resto de reactivos están listos para ser usados.
5. El Búfer de Lavado diluido y el Diluyente de Muestra 2 diluido son estables a 2-8° C durante 6 meses si se evita la contaminación microbiana.
6. Volver a colocar las bandas de microtitulación sobrantes en el paquete metálico y guardar con el producto desecante a 2-8° C hasta su reutilización.
7. No exponer el Substrato a la luz durante el almacenamiento.
8. Evitar la contaminación de reactivos. Utilizar una punta de pipeta nueva desechable para cada manipulación de muestra o reactivo.

### *Signos de Deterioro*

El Substrato debe tener un color amarillo pálido. El color rosa indica contaminación y hay que desechar el reactivo. La turbiedad o precipitación en cualquier componente indica deterioro y hay que desechar el componente.

### **Recogida y Almacenamiento de Muestras**

El análisis está recomendado para muestras de suero/plasma EDTA; no utilizar muestras turbias, hemolizadas ni lipémicas. Mezclar minuciosamente las muestras descongeladas antes del análisis y no volver a congelar/descongelar. No calentar las muestras inactivadas, ya que esto podría producir resultados falsos positivos.

Las muestras pueden almacenarse a una temperatura de -20° C o inferior, o analizarse en un plazo de 12 horas desde su obtención.

## **ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

### **Únicamente para uso diagnóstico in vitro.**

#### **Precauciones de Seguridad**

1. Siga estrictamente las instrucciones de este folleto, especialmente las relativas a la manipulación y las condiciones de almacenamiento.
2. Los Controles contienen plasma humano comprobado mediante análisis aprobados por la FDA para el antígeno de superficie de la hepatitis B, el VHC y el VIH cuyos resultados han sido no reactivos/negativos. Ya que ninguna prueba conocida ofrece una garantía total de que no estén presentes agentes infecciosos, hay que considerar los Controles como potencialmente infecciosos y manipularlos con las mismas precauciones que cualquier otro material potencialmente biopeligroso. El Manual de Salud CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3ª edición, 1993, describe el modo en que se deben manipular estos materiales de acuerdo con una Buena Práctica de Laboratorio. Esto es aplicable en los EE.UU.
3. No pipetar con la boca.
4. No fumar, comer, beber ni aplicar cosméticos en áreas en las que se manipulan kits y muestras.
5. Hay que proteger adecuadamente todas las heridas, cortes y abrasiones de la piel así como otras lesiones dermatológicas.
6. Los Controles, el Conjugado, el Concentrado de Diluyente de Muestra 2 y el Concentrado de Búfer de Lavado contienen azida sódica, que puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas metálicas extremadamente explosivas. Para su eliminación, verter con grandes cantidades de agua para prevenir la formación de azida.
7. La Solución de Parada contiene hidróxido de sodio. Evite el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Si se produce contacto con piel u ojos, lavar con agua y acudir inmediatamente a un médico.
8. El sustrato contiene PMP, Bronidox L, y Dietanolamina. Evite el contacto con la piel, los ojos y mucosas. Si se produce contacto con la piel, los ojos o mucosas, aclárelos con agua y consulte con su médico.
9. Pueden solicitarse a Euro Diagnostica las hojas de datos de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.



**Atención**

**B.**

SUBS

Contiene: Dietanolamina

- |                 |  |
|-----------------|--|
| H319:           | Provoca irritación ocular grave.   |
| P264:           | Lávese bien las manos después de manipular.  |
| P280:           | Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.  |
| P305+P351+P338: | EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. |
| P337+P313:      | Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.   |



**Atención**

**C.**

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

Contiene: Hidróxido de sodio

- H315: Provoca irritación cutánea.  
 H319: Provoca irritación ocular grave.  
 P264: Lávese bien las manos después de manipular.  
 P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.  
 P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.  
 P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.  
 P332+P313: En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.  
 P337+P313: Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.



**Atención**

**D. and F.**

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Contiene: Azida sódica

- H302: Nocivo en caso de ingestión.  
 EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.  
 H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.  
 P264: Lávese bien las manos después de manipular.  
 P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.  
 P301+P312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si se encuentra mal.  
 P273: Evitar su liberación al medio ambiente.

## PREPARACIÓN

### **Materiales/Equipos Necesarios No Suministrados**

1. Lector de banda/placa de vasos 96 con filtro 550nm (es aceptable 540-565nm).
2. Pipetas de precisión para dispensar 10µL, 100µL, 1mL. Pipeta automática para dispensar 100 µL. Pipeta automática para dispensar 200µL para el lavado manual; lavador automático de placa opcional.
3. Cilindros de medición de vidrio/plástico: 1x100mL, 1x400mL.
4. Recipientes con volumen 1mL.
5. Agua destilada/desionizada.
6. Toallitas de papel.
7. Cronómetro para intervalos de 30 y 60 minutos.

**Preparativos para el Análisis**

Dejar que todos los componentes del kit, incluidas las bandas de microtitulación, se templen a 18-25° C durante 30-60 minutos antes de su utilización. Mezclar los reactivos mediante una suave inversión.

**No diluir el Control de Referencia.**

Diluir los siguientes reactivos y mezclar minuciosamente.

Reactivo	Volumen	Añadir
Concentrado de Búfer de Lavado	1 vial	375mL de agua destilada/desionizada
Concentrado de Diluyente de Muestra 2	1 vial	100mL de agua destilada/desionizada
Muestras/Controles Positivos y Negativos	10µL	1mL de Diluyente de Muestra 2 diluido

Calcular el número de bandas de microtitulación necesarias para el análisis actual y sujetarlas en el soporte de bandas de microtitulación. Volver a colocar las bandas sobrantes en el paquete metalizado con el desecante, y almacenarlas en la bolsa de plástico resellable a 2-8° C hasta que sean necesarias. Comprobar que todas las bandas están fijadas con seguridad en el soporte de bandas de microtitulación con la etiqueta de identificación del análisis situada a lo largo del borde inferior bajo la fila H.

**PROTOCOLO DEL ANÁLISIS**

- Vasos de referencia para identificación.
- Pipetar 100µL de Control de Referencia por duplicado, Controles Negativos y Positivos prediluidos, y muestras de pacientes prediluidas, en los vasos correspondientes. No olvide cambiar las puntas de las pipetas entre añadidos. Esta fase no debe durar más de 15 minutos para ningún conjunto de Controles/muestras.
- Incubar 60 ± 10 minutos a 18-25° C.
- Decantar el contenido de la banda mediante inversión rápida sobre un lavabo adecuado para la eliminación de materiales biológicos, teniendo presente el potencial riesgo infeccioso de las muestras. Secar los vasos de las bandas invertidas con toallitas de papel.
- Lavar los vasos **tres veces** con un mínimo de 200µL de Búfer de Lavado diluido. **Decantar y secar después de cada fase de lavado.**
- Añadir 100µL de Conjugado IgG/IgM a cada vaso.
- Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
- Repetir los pasos 4 y 5.
- Añadir 100 µL de Substrato a cada vaso.
- Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C. **No decantar.**
- Añadir 100µL de Solución de Parada a cada vaso, en el mismo orden y ritmo que el Substrato. Agitar los vasos con suavidad para mezclar.
- Leer las bandas a las 24 horas a 550nm (540-565nm).

## CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

**Considerar cada análisis de forma independiente a la hora de calcular e interpretar los resultados.**

Calcular el valor de la tasa de absorbencia (densidad óptica) para los controles Positivos y Negativos, así como para cada muestra.

$$\text{Tasa de Absorbencia} = \frac{\text{Muestra o Valor de Absorbencia del Control}}{\text{Valor de Absorbencia del Control de Referencia promedio}}$$

Los usuarios deben calcular un límite entre las muestras positivas y negativas, que sea específico para sus poblaciones de pacientes. Los resultados de las poblaciones de pacientes utilizadas en la prueba clínica Euro Diagnostica sugieren el siguiente límite:

<u>Tasa de Absorbencia</u>	<u>Interpretación de los Resultados</u>
<0,7	<b>Negativo</b>
≥0,7 a <1,0	<b>Borderline – se recomienda repetir la prueba con otra muestra</b>
≥1,0	<b>Positivo</b>

## CONTROL DE CALIDAD

Comprobar que se lleva a cabo un mantenimiento y una calibración de lector de placa apropiados de acuerdo con las instrucciones del fabricante y que se utiliza la longitud de onda correcta.

Los usuarios deben garantizar que están totalmente familiarizados con las instrucciones para la realización del análisis, especialmente la sección de Advertencias y Precauciones y las Notas sobre Manipulación y Procedimientos. Los usuarios deben demostrar que pueden obtener especificaciones de rendimiento precisas y una gama comunicable de resultados de la prueba comparables a los determinados por el fabricante antes de comunicar resultados de pruebas en pacientes. Se recomienda realizar los Controles Negativos y Positivos prediluidos por duplicado en todos los análisis con el fin de monitorizar la calidad del procedimiento de prueba. Realizar el Control de Referencia listo para su uso por duplicado en todos los análisis.

Suponiendo que se cumplen las especificaciones de precisión descritas por el fabricante, si alguno de los Controles no cumple las especificaciones de tasa de Control que aparecen a continuación, esto anula el análisis y no se deben proporcionar los resultados de este paciente. El operario puede repetir el análisis, tras haber revisado el procedimiento, o ponerse en contacto con el distribuidor/fabricante. Para repetir el análisis, prepare una dilución nueva de cada Control y muestra. Los laboratorios pueden querer incluir controles internos en cada realización del análisis. Guardar dicho material de control a o por debajo de  $-20^{\circ}\text{C}$  y evitar repetir los ciclos de congelación/descongelación. Los conservantes tales como la azida sódica a 0,1 % (c/v) no afectarán a los resultados de la muestra

Los niveles analíticos identificados en determinadas enfermedades son los establecidos por el fabricante para poblaciones específicas y no reflejan necesariamente la literatura. Los niveles de incidencia, su relación con enfermedades específicas, los rangos de referencia y los valores límite apropiados deben calcularse para las poblaciones específicas atendidas por los usuarios.

<b>Especificaciones de Tasa de Control</b>	
$\frac{\text{Absorbencia de Control Positivo}}{\text{Absorbencia de Control de Referencia}}$	Véase etiqueta de Control Positivo
$\frac{\text{Absorbencia de Control Negativo}}{\text{Absorbencia de Control de Referencia}}$	<0.7

## VALORES PREVISTOS

Se analizaron 169 muestras de suero de donantes asintomáticos, aparentemente sanos y sin historia de enfermedad autoinmune o reumática, para los autoanticuerpos IgG e IgM a antígenos nucleares. Esta población procedía de cuatro centros europeos; se compararon los resultados con inmunofluorescencia convencional utilizando células HEp-2 como sustrato. Utilizando una tasa límite de 0,7, se descubrió la siguiente concordancia.

		DIASTAT®	
		+ve	-ve
IFA	+ve	1	1
	-ve	10	158

Concordancia global = 94%

### **Comparación con Inmunofluorescencia**

Se compararon 363 muestras de suero de pacientes con enfermedad del tejido conectivo (ETC) con inmunofluorescencia en muestras de pacientes con enfermedad del tejido conectivo en diversos centros europeos. La positividad o la negatividad en IFA se asignó de acuerdo con los criterios del centro de pruebas.

		DIASTAT®	
		+ve	-ve
IFA	+ve	204	32
	-ve	8	119

Sensibilidad = 86%

Especificidad = 94%

Concordancia global = 89%

### **Comparación con Modelos de Inmunofluorescencia**

Modelo IFA	n	DIASTAT ANA Positivo	% Concordancia
Centrómero	35	34	97
Nucleolar/Moteado	26	25	96
Homogéneo	35	32	91
Moteado	61	53	87
Nucleolar	47	36	77

**Comparación con Inmunofluorescencia según Autoanticuerpos Individuales**

Se comparó el análisis con inmunofluorescencia, con especificidades individuales de autoanticuerpos. Éstas se determinaron utilizando los kits ELISA DIASTAT® específicos.

<b>Especificidad Anticuerpos</b>	<b>DIASTAT Positivo (ANA)</b>	<b>Positivo (IFA)</b>	<b>% Concordancia</b>
Ro (SS-A)	10	10	100
La (SS-B)	6	6	100
Sm	9	9	100
Sm/RNP	20	20	100
Scl-70	38	38	100
DsDNA	15	16	94
Centrómero	61	62	98
Histona	12	13	92

28 muestras, que fueron identificadas como Jo-1 positivas utilizando el ELISA anti-Jo-1 DIASTAT® se realizaron en el kit ANA DIASTAT® con los siguientes resultados:

24/28 (85,7%) fueron positivas en la prueba ANA.

3/28 (10,7%) se consideraron dentro del área borderline. Sus tasas eran de 0,99, 0,86, y 0,78.

1/28 (3,6%) dio una tasa de 0,67.

**DATOS SOBRE EL RENDIMIENTO****Imprecisión**

- Imprecisión en el análisis**, determinada mediante la prueba de tres controles en tres análisis, utilizando tres operarios y tres lotes de kits, con replicación de ocho.

<b>Control</b>	<b>Valor de Absorbencia</b>	<b>SD</b>	<b>%CV</b>
1	0,771	0,026	3,4
2	1,102	0,031	2,8
3	1,136	0,055	4,8

- Imprecisión entre análisis**, determinada mediante la prueba de seis controles en 20 análisis, utilizando tres operarios y ocho lotes de kits, con replicación de cuatro.

<b>Control</b>	<b>Valor de Absorbencia</b>	<b>SD</b>	<b>%CV</b>
1	0,219	0,031	14,2
2	0,273	0,031	11,4
3	0,365	0,036	9,9
4	0,521	0,036	6,9
5	1,078	0,130	12,1
6	1,012	0,131	12,9

---

## LIMITACIONES DE USO

---

1. Aunque la presencia de títulos elevados de autoanticuerpos a antígenos nucleares es indicativa de enfermedades reumáticas sistémicas, hay que considerar los datos a la luz de otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
2. Algunas personas pueden presentar niveles elevados de ANAs con escasas o ninguna evidencia de enfermedad clínica. Por el contrario, algunos pacientes con evidencia de enfermedad clínica pueden tener niveles indetectables de estos anticuerpos.
3. La prueba no identifica la especificidad de anticuerpos ANA. Si una muestra da un resultado positivo, entonces se deben llevar a cabo más pruebas para determinar la especificidad de los autoanticuerpos.
4. Para una repetición de la toma de muestras del paciente, por ejemplo, para monitorización, se debe utilizar el mismo tipo de muestra (suero o plasma EDTA) durante todo el período del estudio.

---

## REFERENCIAS

---

1. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Disease and Probes for Cell Biology. *Advances in Immunology*, **44**, 93-151, 1982.
2. Nakamura RM, Tan EM. Recent Advances in Laboratory Tests and the Significance of Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases. *Clinics in Laboratory Medicine*, **6**, 41-53, 1986.
3. Sharp GC, Irvin WS, et al. Association of Autoantibodies to Different Nuclear Antigens with Clinical Patterns of Rheumatic Disease and Responsiveness to Therapy. *J Clin Invest*, **50**, 350-359, 1971.
4. Friou GJ. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Significance and Methods. *Arthritis Rheum*, **10**, 151-159, 1967.
5. Eds. Nakamura RM, Greenwald CA, et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Advances in Laboratory Tests and Significance in Systemic Rheumatic Diseases. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1978.









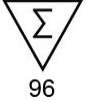


---

## RESUMEN DEL PROTOCOLO

---

1. Diluir muestras y Controles Positivos y Negativos 1:101. No diluir el Control de Referencia.
2. Añadir 100µL del Control de Referencia por duplicado, muestras y Controles Negativos y Positivos prediluidos en los vasos referenciados de la banda de microtitulación.
3. Incubar 60 ± 10 minutos a 18-25° C.
4. Lavar las bandas 3 veces.
5. Añadir 100µL de Conjugado IgG/IgM a cada vaso.
6. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
7. Lavar las bandas 3 veces.
8. Añadir 100µL de Substrato a cada vaso.
9. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
10. Añadir 100µL de Solución de Parada a cada vaso.
11. Leer la absorbencia a 550nm.



	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Código do lote / Lotnummer / Satsnummer
	Catalogue number / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Referência de catálogo / Bestillingsnummer / Katalognummer
	Use by / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Prazo de validade / Skal anvendes inden / Hållbar till
	Temperature limitation / Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura / Limites de temperatura / Opbevares ved / Temperaturgrænser
	Biological risks / Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung / /Rischio biologico / Risco biológico / Biologiske risici / Biologisk risk
	Consult instructions for use / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte as instruções de utilização / Læs brugsvejledning / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik / In vitro diagnostika
	Manufacturer / Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Fabricante Producent / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Contém o suficiente para "n" testes / Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Atenção / Advarsel / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro / Conformidade com In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC, Diretiva de Dispositivos Médicos / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

<b>CONJ</b>	Conjugate / Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Conjugado / Konjugat Konjugat
<b>SUBS</b>	Substrate / Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrato / Substrat / Substrat
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution / Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung / Soluzione bloccante / Solução de paragem / Stopopløsning / Stopplösning
<b>BUF WASH 16 x</b>	Wash buffer concentrate (16 X) / Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tampão de lavagem concentrado (16 X) / Vaskebufferkoncentrat (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
<b>Ag</b>	Hep-2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Hep-2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con HEp-2 / Hep-2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Hep-2 e supporto per strip / Poços revestidos com HEp-2 e suporte de tiras / Hep-2-coatede brønde og strip- holder / Hep-2-klädda brunnar och striphållare
<b>DIL SPE 5 X</b>	Sample Diluent 2 Concentrate (5 X) / Concentré 2 diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente 2 de Muestra (5 X) / Probediluens 2-Konzentrat / Diluente per campioni 2 concentrato (5 X) / Diluente de Amostras 2 concentrado (5 X) / Prøvediluent 2-koncentrat (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
<b>CONTROL REF</b>	ANA Reference Control / Témoin de référence ANA / Control de Referencia ANA / ANA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento ANA / Controllo de referência de ANAs / ANA Referencekontrol / ANA referenskontroll
<b>CONTROL +</b>	Positive Controls / Témoins positifs / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Controlos Positivos / Positive kontrollen / Positiva kontrollen
<b>CONTROL -</b>	Negative Controls / Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Controlos Negativos / Negative kontrollen / Negativa kontrollen

---

## DEUTSCH: ANWENDUNGSGEBIETE

---

Der DIASTAT® Test auf antinukleäre Antikörper (ANA) ist ein qualitativer Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zum Nachweis von ANA im menschlichen Serum oder EDTA-Plasma. Er weist ANA gegen Sm-, Sm/RNP-, Ro-(SS-A)-, La-(SS-B)-, Scl-70-, Jo-1-, dsDNA-, Histon- und Zentromer-Antigene nach.

Der Test kann zum Ausscreenen von Proben eingesetzt werden, die für alle ANA negativ sind. Proben, die ein positives Testergebnis liefern, sind weiteren Tests zum Nachweis des/der vorhandenen antigenspezifischen Antikörper zu unterziehen. Für den Einzelnachweis von Sm-, Sm/RNP-, Ro-SS-A)-, La-(SS-B)-, dsDNA- und Zentromer-ANAs gibt es spezielle quantitative/qualitative ELISA Kits. Qualitative Kits gibt es für den Einzelnachweis von Scl-70 und Jo-1. Der Nachweis von antinukleären Antikörpern stellt nur einen Parameter in einem sich aus vielen Kriterien zusammensetzenden Diagnoseprozess dar.

---

## EINLEITUNG

---

Systemische Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises sind Autoimmunkrankheiten, wie zum Beispiel systemischer Lupus erythematoses (SLE), Polymyositis, Sjögren-Syndrom, Sklerodermie, Mischformen der Konnektivitiden, CREST und rheumatoide Arthritis. Ein allgemeines Merkmal für systemische rheumatische Erkrankungen ist das Vorliegen zirkulierender Antikörper gegen eine Reihe verschiedener zellulärer Antigene. Der Nachweis und die serologische Charakterisierung spezifischer Autoantikörper spielen bei der Differentialdiagnose dieser Erkrankungen eine wichtige Rolle.

Autoantikörper gegen nukleäre Antigene (ANA) sind eine Gruppe spezifischer Antikörper gegen nukleäre Antigene, zu denen Sm-, Sm/RNP-, Ro-(SS-A)- La-(SS-B)-, Scl-70-, Jo-1-, dsDNA-, Histon- und Zentromer-Antigene zählen. Ein positives ANA Testergebnis liefert Anhaltspunkte für eine mutmaßliche systemische rheumatische Erkrankung<sup>1,2</sup>; die weitere Definition spezifischer Antikörperprofile ist eine wertvolle Hilfe im diagnostischen Prozess. Für den Nachweis von ANA gibt es eine ganze Reihe von Methoden, wie z.B. Hämagglutination, Immundiffusion und die indirekte Immunfluoreszenz<sup>3,4,5</sup>. Diese Tests sind allerdings mit einigen Nachteilen behaftet, wie mangelnde Sensitivität und Reproduzierbarkeit, und sie sind zudem für das Testen großer Chargen ungeeignet. ELISAs bieten eine über andere Methoden hinausgehende Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Objektivität und Flexibilität bei Tests von Chargenumfang.

Der DIASTAT® Test dient zum Nachweis von Gesamt-IgG- und IgM-Antikörpern gegen die extrahierbaren nukleären Antigene Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, dsDNA, Histon- und Zentromer-Antigene. Er dient auch zum Nachweis von Autoantikörpern im Serum, die homogene, zentromere und gesprenkelte/nukleolenartige Muster in herkömmlichen IFA-Tests ergeben. Der DIASTAT® ELISA eignet als Hauptscreening auf Gesamtantikörper. Ein negatives Resultat verringert die Wahrscheinlichkeit für eine systemische rheumatische Erkrankung, schließt diese aber nicht aus. Positive Ergebnisse sind weiteren Tests zur Identifikation vorhandener spezifischer Autoantikörper zu unterziehen.




---

## TESTPRINZIP

---

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit hochreinem HEp-2 Zellextrakt beschichtet. Während der ersten Inkubation binden sich in verdünntem Serum oder EDTA-Plasma vorliegende spezifische ANA an die mit Antigen beschichtete Oberfläche. Die Vertiefungen werden dann zur Entfernung gebundener Komponenten gewaschen. Bei der zweiten Inkubation heftet sich das Konjugat, d.i. gegen humanes IgG und IgM gerichtete Enzym-markierte Antikörper, an alle Oberflächen-gebundenen Autoantikörper. Nach weiterem Waschen werden spezifische Autoantikörper durch Inkubation mit dem Substrat nachgewiesen. Die Reaktion wird durch Zugabe von Stopplösung unterbrochen und führt zu einem farbigen Endprodukt. Die gebundene Konjugatmenge wird in Extinktionseinheiten gemessen und mit der durch die entsprechende Referenzkontrolle gebundenen Konjugatmenge verglichen.

## TESTKIT-REAGENZIE

<b>A</b>	IgG/IgM Konjugat	1 x 15mL	Mit alkalischer Phosphatase markierter Antikörper gegen Human-IgG und -IgM, Tris-Puffer, Proteinstabilisator, <0,1% (w/v) Natriumazid. <b>Gebrauchsfertig.</b>	
<b>B</b>	Substrat	1 x 15mL	Mg <sup>2+</sup> , Phenolphthaleinmonophosphat (PMP), Pufferlösung. <b>Gebrauchsfertig.</b> Lichtgeschützt lagern.	
<b>C</b>	Stopplösung	1 x 15mL	Natriumhydroxid, EDTA, Carbonatpuffer (pH >10). <b>Gebrauchsfertig.</b>	
<b>D</b>	Waschpuffer-Konzentrat (16X)	2 x 25mL	Boratpuffer, 0,4% (w/v) Natriumazid. <b>Vor Gebrauch verdünnen.</b>	
<b>E</b>	HEp-2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen	12 x 8 Streifen mit Mikrotitervertiefungen	Beschichtet mit HEp-2-Zellextrakt, in einer wieder verschließbaren Folienpackung mit Trockenmittel.	
<b>F</b>	Probendiluens-2-Konzentrat (5X)	1 x 25mL	Phosphatepuffer, Proteinstabilisator, 5% (w/v) Triton-X-100, 0,5% (w/v) Natriumazid. <b>Vor Gebrauch verdünnen.</b>	
<b>6</b>	ANA-Referenzkontrolle	1 x 1,5mL	Humanplasma, Puffer, <0,1% (w/v) Natriumazid. <b>Gebrauchsfertig.</b>	
<b>+/-</b>	Positiv Kontrolle Negativ-Kontrolle	1 x 0,2mL 1 x 0,1mL	Humanplasma, <0,1% (w/v) Natriumazid. <b>Vor Gebrauch mit Probendiluens 2 1:101 verdünnen, wie für Proben.</b>	
	Packungsbeilage			

## LAGERUNG DER REAGENZIE

### **Haltbarkeit des geöffneten Testkits**

Ein Testkit wurde geöffnet und während einer dreimonatigen Periode dreimalig ohne nachteilige Wirkung auf die Kitleistung wiederverwendet.

### **Handhabungs- und Verfahrenshinweise**

1. Die Testkit-Bestandteile bei 2-8° C lagern und bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Verfalldatum verwenden. Reagenzien nicht über das Verfalldatum hinaus verwenden.
2. Reagenzien aus verschiedenen Testkit-Chargen dürfen nicht miteinander gemischt werden.
3. Testkits nicht einfrieren.
4. Waschpuffer-Konzentrat, Probendiluens-2-Konzentrat und Positiv- und Negativ-Kontrollen müssen vor dem Gebrauch verdünnt werden. Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.
5. Verdünnter Waschpuffer und verdünntes Probendiluens 2 sind bei 2-8° C bis zu 6 Monate beständig, wenn eine mikrobielle Kontamination vermieden wird.
6. Überzählige Mikrotiterstreifen in die Folienpackung zurückgeben mit dem Trockenmittel bis zum Gebrauch bei 2-8° C lagern.
7. Das Substrat während der Lagerung nicht der Lichteinwirkung aussetzen.
8. Die Kontamination der Reagenzien vermeiden. Für jedes Reagenz oder Probe eine neue Einmalpipettenspitze verwenden.

### **Anzeichen einer Wertminderung**

Das Substrat soll hellgelb aussehen. Eine Rosafärbung ist ein Anzeichen für eine Kontamination, und das Reagenz muss verworfen werden. Trübung oder Niederschlag in einem Bestandteil sind Anzeichen einer Wertminderung, und der Bestandteil muss verworfen werden.

### **Probensammlung und Aufbewahrung**

Der Test wird für Serum-/EDTA-Plasmaproben empfohlen; lipämische, hämolysierte oder trübe Proben dürfen nicht verwendet werden. Aufgetaute Proben vor dem Test gründlich mischen, und erneutes Einfrieren/Auftauen vermeiden. Proben nicht durch Erhitzen inaktivieren, da dies zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.

Die Proben können bei oder unter -20° C aufbewahrt oder innerhalb von 12 Stunden nach der Entnahme getestet werden.

## **WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

### **Nur für die Anwendung als In-vitro-Diagnostikum.**

#### **Vorsichtsmaßnahmen**

1. Die Anleitungen in dieser Broschüre, besonders die Handhabungs- und Lagerungsvorschriften, strikt befolgen.
2. Die Kontrollen enthalten menschliches Plasma und wurden gemäß den geltenden FDA-Richtlinien auf Hepatitis-B-Surface-Antigen, HCV und HIV getestet und als nicht reaktiv/negativ befunden. Da keine bekannte Testmethode die absolute Gewähr für Pathogenfreiheit bieten kann, müssen alle Kontrollen als potentiell infektiös angesehen und unter Beachtung der gleichen Sicherheitsrichtlinien wie andere potentiell gefährliche biologische Materialien behandelt werden. Das CDC/NIH-Gesundheitshandbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3. Auflage, 1993, beschreibt wie diese Materialien unter Beachtung der Good Laboratory Practice (GLP) zu handhaben sind. Dies trifft in den USA zu.
3. Nicht mit dem Mund pipettieren.
4. In Bereichen, in denen Testkits und Proben gehandhabt werden, nicht rauchen, essen, trinken und keine Kosmetika anwenden.
5. Alle erkrankten Hautareale, Schnitte, Abschürfungen und weitere Hautläsionen ausreichend schützen.
6. Kontrollen, Konjugat, Probendiluens-2-Konzentrat und Waschpuffer-konzentrat enthalten Natriumazid, das mit Blei- und Kupferrohren unter Bildung hoch explosiver Metallazide reagieren kann. Zur Vermeidung einer Azidansammlung bei der Entsorgung mit reichlich Wasser wegspülen.
7. Die Stopplösung enthält Natriumhydroxid. Den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden. Verschüttetes Natriumhydroxid muss mit reichlich Wasser aufgewischt werden. Wenn Berührung mit Augen oder Haut auftritt, mit Wasser abspülen und sofort den Arzt konsultieren.
8. Das Substrat enthält PMP, Bronidox L und Dietanolamin. Kontakt mit Haut, Augen und Atemwege vermeiden. Bei Kontakt mit Haut, Augen oder Atemwege mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
9. Sicherheitsdatenblätter für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile sind auf Anfrage von Euro Diagnostica erhältlich.



**Achtung**

**B.**

SUBS

Enthält: Dietanolamin

- |                 |  |
|-----------------|--|
| H319:           | Verursacht schwere Augenreizung.   |
| P264:           | Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.   |
| P280:           | Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.  |
| P305+P351+P338: | BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. |
| P337+P313:      | Im Falle einer anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.   |



C.

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

**Achtung**

Enthält: Natriumhydroxid

- H315: Verursacht Hautreizungen.  
 H319: Verursacht schwere Augenreizung.  
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.  
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.  
 P302+P352: BEI HAUT KONTAKT: Mit sehr viel Seife und Wasser waschen.  
 P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.  
 P332+P313: Im Falle einer Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.  
 P337+P313: Im Falle einer anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

**Achtung**

Enthält: Natriumazid

- H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.  
 EUH032: Kontakt mit Säure setzt sehr giftige Gase frei.  
 H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit lang anhaltender Wirkung.  
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.  
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.  
 P301+P312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.  
 P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

## VORBEREITUNG

### **Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien/Geräte**

1. Lesegerät mit 550 nm Filter (540-565 nm ist zulässig) für eine Platte/einen Streifen mit 96 Vertiefungen.
2. Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 µL, 100 µL und 1mL. Automatische Pipette zum Pipettieren von 100 µL. Automatische Pipette zum Pipettieren von 200 µL zum manuellen Waschen, wahlweise mit einem automatischen Plattenwäscher.
3. Glas-/Kunststoffmesszylinder: 1x100 mL, 1x400 mL.
4. Gefäße zur Aufnahme eines 1mL Volumens
5. Destilliertes/deionisiertes Wasser.
6. Papiertücher.
7. Stoppuhr für 30 und 60 Minuten Intervalle.

### Vorbereitung zur Testdurchführung

Alle Testkit-Bestandteile, einschließlich der Mikrotiterstreifen, vor Gebrauch 30-60 Minuten auf bis zu 18-25° C anwärmen. Die Reagenzien durch vorsichtiges Schwenken mischen.

**Die Referenzkontrolle nicht verdünnen.**

Die folgenden Reagenzien verdünnen und gründlich mischen.

Reagenz	Volumen	Zugabe
Waschpufferkonzentrat	1 Flasche	375mL destilliertes/deionisiertes Wasser
Probendiluens-2-Konzentrat	1 Flasche	100mL destilliertes/deionisiertes Wasser
Positiv- und Negativ-Kontrollen/Proben	10 µL	1mL verdünntes Probendiluens 2

Die Anzahl der für den jeweiligen Test erforderlichen Mikrotiterstreifen berechnen, und diese in dem Mikrotiterstreifenrahmen vorstecken. Die übrigen Streifen in die Folienpackung mit dem Trockenmittel zurückgeben und bis zum nächsten Gebrauch in dem wieder verschließbaren Plastikbeutel bei 2-8° C aufbewahren. Darauf achten, dass alle Streifen in dem Mikrotiterstreifenrahmen sicher eingesteckt sind, indem sich der Testidentifikationsstreifen entlang der unteren Kante unter Reihe H befindet.

## TESTPROTOKOLL

1. Referenzvertiefungen zum Nachweis.
2. 100µL der entsprechenden Referenzkontrolle (Doppelbestimmung), vorverdünnte Positiv- und Negativ-Kontrollen und vorverdünnte Patientenproben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Dieser Schritt darf für die jeweilige Kontroll-/Probenreihe nicht länger als 15 Minuten dauern.
3. 60 ± 10 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
4. Den Streifeninhalt durch schnelles Umkehren über einem für die Entsorgung biologischer Materialien geeigneten Spülbecken dekantieren, wobei die potentielle Infektionsgefahr der Proben zu berücksichtigen ist. Die umgekehrten Streifen gründlich mit Papiertüchern abtupfen.
5. Die Vertiefungen **dreimal** mit mindestens 200µL verdünntem Waschpuffer waschen. **Dekantieren und nach jedem Waschschrift abtupfen.**
6. In jede Vertiefung 100µL IgG/IgM Konjugat geben.
7. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
8. Schritte 4 und 5 wiederholen.
9. In jede Vertiefung 100 µL Substrat geben.
10. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren. **Nicht dekantieren.**
11. In der gleichen Reihenfolge und Rate wie für das Substrat in jede Vertiefung 100 µL Stopplösung geben. Die Vertiefungen durch vorsichtiges Beklopfen mischen.
12. Die Streifen innerhalb von 24 Stunden bei 550 nm (540-565 nm) ablesen.

## BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

**Bei der Berechnung und Interpretation der Ergebnisse jeden Test getrennt auswerten.**

Des Verhältnis des Extinktionswertes (optische Dichte) für Positiv- und Negativ-Kontrollen und für jede Probe berechnen.

$$\text{Extinktionsverhältnis} = \frac{\text{Extinktionswert der Probe oder Kontrolle}}{\text{Mittelwert der Extinktion der Referenzkontrolle}}$$

Die Anwender müssen einen für ihre Patientenpopulationen spezifischen Cut-off-Wert zwischen positiven und negativen Proben berechnen. Die Ergebnisse von den Patientenpopulationen, die an der von Euro Diagnostica durchgeführten klinischen Prüfung teilnahmen, deuten auf den folgenden Cut-off-Wert hin:

<u>Extinktionsverhältnis</u>	<u>Interpretation der Ergebnisse</u>
<0,7	Negativ
≥0,7 bis <1,0	Borderline – Testwiederholung bei der nachfolgenden Probe empfohlen
≥1,0	Positiv

## QUALITÄTSKONTROLLE

Darauf achten, dass eine angemessene Instandhaltung und Kalibrierung des Plattenlesegerätes nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt und die richtige Wellenlänge angewendet wird. Die Laboratorien sollten sicherstellen, dass das Personal mit der Testanleitung, besonders aber den Abschnitten zu den Warnungs- und Vorsichtsmaßnahmen sowie den Handhabungs- und Verfahrenshinweisen vollkommen vertraut ist. Das Personal muss darüber hinaus den Nachweis erbringen, dass es vor der Herausgabe der Patientenergebnisse Leistungsspezifikationen in Bezug auf die Präzision und den zu berichtenden Bereich der Testergebnisse erheben kann, die mit den von dem Hersteller vorgegebenen vergleichbar sind. Zur Überwachung der Qualität des Testverfahrens wird empfohlen, dass die vorverdünnten Positiv- und Negativ-Kontrollen in allen Tests als Doppelbestimmung mitlaufen. Bei allen Tests muss die gebrauchsfertige Referenzkontrolle als Doppelbestimmung mitlaufen. Vorausgesetzt, dass die vom Hersteller beschriebenen Präzisionsspezifikationen erfüllt werden, ist der Test ungültig und die Patientenergebnisse dürfen nicht herausgegeben werden, wenn eine Kontrolle nicht den unten angegebenen Kontrollverhältnis-Spezifikationen entspricht. Der Test kann nach Überprüfung des Verfahrens oder Kontaktaufnahme mit dem Händler/Hersteller wiederholt werden. Bei Wiederholung des Tests eine frische Verdünnung von jeder Kontrolle und der Probe herstellen. Einige Laboratorien möchten bei jedem Testdurchlauf gegebenenfalls auch ihre laboreigenen Kontrollen mitlaufen lassen. Dieses Kontrollmaterial muss bei oder unter -20°C aufbewahrt werden, wobei wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden sind. Die Ergebnisse der Proben werden durch Konservierungsmittel, wie zum Beispiel Natriumazid (0,1% (w/v)) nicht beeinflusst. Bei den Konzentrationen von Analyten, die bei bestimmten Erkrankungen nachgewiesen werden, handelt es sich um diejenigen, die von dem Hersteller für spezifische Populationen vorgegeben werden und stimmen nicht unbedingt mit den in der Literatur angegeben überein. Inzidenz-Grade, ihr Zusammenhang mit spezifischen Erkrankungen, Referenzbereiche und geeignete Cut-off-Punkte sind von dem jeweiligen Laboratorium für die von ihnen betreuten spezifischen Populationen zu berechnen.

<b>Kontrollverhältnis-Spezifikationen</b>	
$\frac{\text{Extinktion für die Positive Kontrolle}}{\text{Extinktion der Referenzkontrolle}}$	Siehe Etikett für die Positiv-Kontrolle
$\frac{\text{Extinktion für die Negativ Kontrolle}}{\text{Extinktion der Referenzkontrolle}}$	<0,7



## ERWARTETE WERTE

169 Serumproben von asymptomatischen, scheinbar gesunden Spendern ohne Autoimmun- oder rheumatische Erkrankungen in der Vorgeschichte wurden auf IgG- und IgM-Autoantikörper gegen nukleäre Antigene getestet. Diese Population wurde in vier europäischen Zentren aufgenommen; die Ergebnisse wurden mit herkömmlichen Immunfluoreszenztests mit Hep-2-Zellen als Substrat verglichen. Bei Zugrundelegung eines Cuf-off-Verhältnisses von 0,7 wurde die folgende Übereinstimmung gefunden.

		DIASTAT <sup>®</sup>	
		+ve	-ve
IFA	+ve	1	1
	-ve	10	158

Übereinstimmung insgesamt = 94%

### *Vergleich mittels Immunfluoreszenz*

363 Serumproben von Patienten mit Konnektividen wurden mittels Immunfluoreszenz mit Proben von Patienten mit Konnektividen aus einer Reihe von europäischen Zentren verglichen. Eine Positivität oder Negativität beim IFA wurde entsprechend den Kriterien des Prüfzentrums zugeordnet.

		DIASTAT <sup>®</sup>	
		+ve	-ve
IFA	+ve	204	32
	-ve	8	119

Sensitivität = 86%

Spezifizität = 94%

Übereinstimmung insgesamt = 89%

### *Vergleich mit Immunfluoreszenzmustern*

IFA-Muster	n	DIASTAT ANA Positiv	% Übereinstimmung
Zentromer	35	34	97
Nukleolenartig/ gesprenkelt	26	25	96
Homogen	35	32	91
Gesprenkelt	61	53	87
Nukleolenartig	47	36	77

**Vergleich mittels Immunfluoreszenz nach einzelnen Autoantikörpern**

Der Test wurde mittels Immunfluoreszenz mit einzelnen Autoantikörperspezifitäten verglichen. Diese wurden mithilfe der spezifischen DIASTAT® ELISA Kits bestimmt.

Antikörper-spezifität	DIASTAT Positiv (ANA)	Positiv (IFA)	% Übereinstimmung
Ro (SS-A)	10	10	100
La (SS-B)	6	6	100
Sm	9	9	100
Sm/RNP	20	20	100
Scl-70	38	38	100
DsDNA	15	16	94
Zentromer	61	62	98
Histon	12	13	92

28 mit dem DIASTAT® Anti-Jo-1 ELISA als Jo-1-positiv identifizierte Proben wurden mit dem DIASTAT® ANA Kit getestet, mit folgendem Resultat:  
 24/28 (85,7%) waren im ANA-Test positiv.  
 3/28 (10,7%) lagen im Borderline-Bereich. Die Verhältnisse waren 0,99, 0,86 und 0,78.  
 1/28 (3,6%) ergaben ein Verhältnis von 0,67.

**LEISTUNGSMERKMALE****Impräzision**

- Die Impräzision in der Serie (**Intraassay-Impräzision**) wurde durch Testen von drei Kontrollen in drei Tests durch drei Laboranten und mit drei Kitchargen und mit Wiederholung von acht bestimmt.

Kontrolle	Extinktionswert	SD	VK (%)
1	0,771	0,026	3,4
2	1,102	0,031	2,8
3	1,136	0,055	4,8

- Die Impräzision von Tag zu Tag (**Interassay-Impräzision**) wurde durch Testen von sechs Kontrollen in 20 Tests durch drei Laboranten und mit acht Kitchargen und mit Wiederholung von vier bestimmt.

Kontrolle	Extinktionswert	SD	VK (%)
1	0,219	0,031	14,2
2	0,273	0,031	11,4
3	0,365	0,036	9,9
4	0,521	0,036	6,9
5	1,078	0,130	12,1
6	1,012	0,131	12,9

---

## ANWENDUNGSGRENZEN

---

1. Obgleich das Vorliegen hoher Autoantikörper-Titer gegen nukleäre Antigene auf systemische rheumatische Erkrankungen hindeutet, dürfen diese Daten nur zusammen mit anderen klinischen und Laborbefunden in Betracht gezogen werden.
2. Bei einigen Patienten können hohe ANA-Spiegel mit wenig oder keinen Hinweisen auf eine klinische Erkrankung vorliegen. Andererseits können bei einigen Patienten mit Anhaltspunkten für eine klinische Erkrankung nicht nachweisbare Spiegel dieser Antikörper vorliegen.
3. Der Test weist die ANA-Antikörperspezifität nicht nach. Liefert eine Probe ein positives Ergebnis, sind weitere Tests zur Bestimmung der Autoantikörper-Spezifität durchzuführen.
4. Für eine wiederholte Probengewinnung vom Patienten, zum Beispiel zur Überwachung, ist die gesamte Studienperiode über immer der gleiche Probentyp (Serum oder EDTA-Plasma) zu verwenden.

---

## LITERATUR

---

1. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Disease and Probes for Cell Biology. *Advances in Immunology*, **44**, 93-151, 1982.
2. Nakamura RM, Tan EM. Recent Advances in Laboratory Tests and the Significance of Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases. *Clinics in Laboratory Medicine*, **6**, 41-53, 1986.
3. Sharp GC, Irvin WS, et al. Association of Autoantibodies to Different Nuclear Antigens with Clinical Patterns of Rheumatic Disease and Responsiveness to Therapy. *J Clin Invest*, **50**, 350-359, 1971.
4. Friou GJ. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Significance and Methods. *Arthritis Rheum*, **10**, 151-159, 1967.
5. Eds. Nakamura RM, Greenwald CA, et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Advances in Laboratory Tests and Significance in Systemic Rheumatic Diseases. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1978.

---

## ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

---





1. Die Proben und Positiv- und Negativ-Kontrollen 1:101 verdünnen. Die Referenzkontrolle nicht verdünnen.
2. 100µL Referenzkontrolle (in Doppelbestimmung), vorverdünnte Positiv- und Negativ-Kontrollen und Proben in die entsprechend gekennzeichneten Vertiefungen des Mikrotiter-Streifens geben.
3. 60 ± 10 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
4. Streifen 3-mal waschen.
5. In jede Vertiefung 100µL IgG/IgM-Konjugat geben.
6. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
7. Streifen 3-mal waschen.
8. In jede Vertiefung 100 µL Substrate geben.
9. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
10. In jede Vertiefung 100 µL Stopplösung geben.
11. Extinktion bei 550 nm ablesen.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Código do lote / Lotnummer / Satsnummer
	Catalogue number / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Referência de catálogo / Bestillingsnummer / Katalognummer
	Use by / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Prazo de validade / Skal anvendes inden / Hållbar till
	Temperature limitation / Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura / Limites de temperatura / Opbevares ved / Temperaturgrænser
	Biological risks / Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung / /Rischio biologico / Risco biológico / Biologiske risici / Biologisk risk
	Consult instructions for use / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte as instruções de utilização / Læs brugsvejledning / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik / In vitro diagnostika
	Manufacturer / Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Fabricante Producent / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Contém o suficiente para "n" testes / Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Atenção / Advarsel / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro / Conformidade com In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC, Diretiva de Dispositivos Médicos / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

<b>CONJ</b>	Conjugate / Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Conjugado / Konjugat Konjugat
<b>SUBS</b>	Substrate / Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrato / Substrat / Substrat
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution / Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung / Soluzione bloccante / Solução de paragem / Stopopløsning / Stopplösning
<b>BUF WASH 16 x</b>	Wash buffer concentrate (16 X) / Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tampão de lavagem concentrado (16 X) / Vaskebufferkoncentrat (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
<b>Ag</b>	Hep-2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Hep-2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con HEp-2 / Hep-2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Hep-2 e supporto per strip / Poços revestidos com HEp-2 e suporte de tiras / Hep-2-coatede brønde og strip- holder / Hep-2-klädda brunnar och striphållare
<b>DIL SPE 5 X</b>	Sample Diluent 2 Concentrate (5 X) / Concentré 2 diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente 2 de Muestra (5 X) / Probediluens 2-Konzentrat / Diluente per campioni 2 concentrato (5 X) / Diluente de Amostras 2 concentrado (5 X) / Prøvediluent 2-koncentrat (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
<b>CONTROL REF</b>	ANA Reference Control / Témoin de référence ANA / Control de Referencia ANA / ANA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento ANA / Controllo de referência de ANAs / ANA Referencekontrol / ANA referenskontroll
<b>CONTROL +</b>	Positive Controls / Témoins positifs / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Controlos Positivos / Positive kontrollen / Positiva kontrollen
<b>CONTROL -</b>	Negative Controls / Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Controlos Negativos / Negative kontrollen / Negativa kontrollen



## COMPONENTI DEL KIT

<b>A</b>	Coniugato IgG/IgM	1 x 15mL	Anticorpi, marcati con fosfatasi alcalina per l'IgG e l'IgM umana, tampone Tris, stabilizzante delle proteine, azide di sodio <0,1% (p/v). <b>Pronto per l'uso.</b>	
<b>B</b>	Substrato	1 x 15mL	Mg <sup>2+</sup> , fenoltaleina monofosfato (PMP), soluzione tampone. <b>Pronto per l'uso.</b> Conservare evitando l'esposizione alla luce.	
<b>C</b>	Soluzione bloccante	1 x 15mL	Idrossido di sodio, EDTA, tampone carbonato (pH >10). <b>Pronta all'uso.</b>	
<b>D</b>	Tampone di lavaggio concentrato (16X)	2 x 25mL	Tampone borato, azide di sodio 0,4% (p/v). <b>Diluire prima dell'uso.</b>	
<b>E</b>	Pozzetti rivestiti con HEp-2 e supporto per strip	8 pozzetti di microtitolazione da 12 strip	Rivestiti con estratto cellulare HEp-2, in confezione di alluminio risigillabile con essiccante.	
<b>F</b>	Diluente per campioni 2 concentrato (5X)	1 x 25mL	Tampone fosfato, stabilizzante delle proteine, 5% (p/v) Triton X-100, azide di sodio 0,5% (p/v). <b>Diluire prima dell'uso.</b>	
<b>6</b>	Controllo di riferimento ANA	1 x 1,5mL	Plasma umano, tampone, azide di sodio <0,1% (p/v). <b>Pronto per l'uso.</b>	
<b>+/-</b>	Controllo positivo Controllo negativi	1 x 0,2mL 1 x 0,1mL	Plasma umano, azide di sodio <0,1% (p/v). <b>Diluire 1:101 con il diluente per campioni 2 diluito prima dell'uso, come per i campioni.</b>	
	Foglio illustrativo			

## CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

### *Stabilità del kit aperto*

Un kit è stato aperto e utilizzato in tre occasioni, in un periodo di tre mesi, con nessun segno di deterioramento prestazionale.

### *Note sulla manipolazione e sulla procedura*

1. Conservare i componenti del kit a temperature comprese tra 2° C e 8° C fino alla data di scadenza riportata sulle etichette. Non utilizzare i reagenti scaduti.
2. Non miscelare componenti appartenenti a lotti di numero diverso.
3. Non congelare i kit.
4. Prima dell'uso, diluire il tampone di lavaggio concentrato, il diluente per campioni 2 concentrato e i controlli positivi e negativi. Tutti gli altri reagenti sono pronti per l'uso.
5. Una volta diluiti, il tampone di lavaggio e il diluente per campioni 2 sono stabili a temperature comprese tra 2° C e 8° C per un periodo massimo di 6 mesi, in assenza di contaminazione microbica.
6. Riporre le strip di microtitolazione inutilizzate nella confezione di alluminio, contenente essiccante, e conservare a temperature comprese tra 2° C e 8° C fino al momento dell'uso.
7. Conservare il substrato senza esporlo alla luce.
8. Evitare di contaminare i reagenti. Per ciascun reagente o a ogni manipolazione dei campioni, utilizzare un nuovo puntale per le pipette.

### *Indicazioni di deterioramento*

Il substrato deve essere di colore giallo pallido. Una colorazione rosa è indice di contaminazione e il reagente va smaltito. La torbidità o la precipitazione di un componente qualsiasi è indice di deterioramento e il componente va smaltito.

**Raccolta e conservazione dei campioni**

Il dosaggio è indicato per i campioni di siero o plasma EDTA; non utilizzare campioni lipemici, emolizzati o torbidi. Miscelare accuratamente i campioni scongelati prima del test; evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti. Non inattivare mediante calore i campioni, per evitare di ottenere falsi positivi. I campioni possono essere a temperature eguali o inferiori a -20° C, oppure analizzati entro 12 ore dal prelievo.

**AVVERTENZE E PRECAUZIONI****Per solo uso diagnostico *in vitro*.****Precauzioni di sicurezza**

1. Attenersi strettamente alle istruzioni contenute in questo opuscolo, in particolare per quanto concerne le condizioni di manipolazione e di conservazione.
2. I controlli contengono plasma umano, analizzato mediante metodologie approvate dall'FDA per l'antigene di superficie per il virus dell'epatite B e C, l'antigene e gli anticorpi dell'HIV e dimostrato non reattivo/negativo. Considerato che nessun test offre la certezza assoluta dell'assenza di agenti infettivi, i controlli vanno considerati potenzialmente infetti e manipolati con le stesse precauzioni adottate per altri materiali potenzialmente biopericolosi. Nel manuale CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3ª edizione, 1993, viene descritto come manipolare questi materiali, conformemente alla buona pratica di laboratorio. Questo non è applicabile negli Stati Uniti d'America.
3. Non pipettare con la bocca.
4. Non fumare, non mangiare, non bere né usare cosmetici in aree dove vengono manipolati i kit e campioni.
5. Proteggere adeguatamente qualsiasi eruzione cutanea, taglio, abrasione o altre lesioni cutanee.
6. I controlli, il coniugato, il diluente per campioni 2 concentrato e il tampone di lavaggio concentrato contengono azide di sodio, che reagisce con tubature in piombo e rame, formando azidi metalliche altamente esplosive. Smaltire negli scarichi unitamente ad abbondanti quantità d'acqua per evitare l'accumulo di azide.
7. La soluzione bloccante contiene idrossido di sodio. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose. Eventuali spandimenti vanno mescolati con acqua abbondante e raccolti con materiale assorbente. Se viene a contatto con la pelle o gli occhi, irrigare con acqua e rivolgersi immediatamente al medico.
8. Il substrato contiene PMP, Bronidox L e dietanolamina. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e il sistema respiratorio. In caso di contatto con queste parti risciacquare con acqua e consultare un medico.
9. Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Euro Diagnostica.

**Attenzione****B.**

SUBS

Contiene: Dietanolamine

H319:	Provoca grave irritazione oculare.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P305+P351+P338:	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P337+P313:	Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.





C.

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

**Attenzione**

Contiene: Idrossido di sodio

H315:	Provoca irritazione cutanea.
H319:	Provoca grave irritazione oculare.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P302+P352:	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
P305+P351+P338:	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P332+P313:	In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.
P337+P313:	Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

**Attenzione**

Contiene: Azide di sodio

H302:	Nocivo se ingerito.
EUH032:	A contatto con acidi libera gas molto tossici.
H412:	Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso..
P301+P312:	IN CASO DI INGESTIONE accompagnata da malessere: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
P273:	Non disperdere nell'ambiente.

## PREPARAZIONE

### **Materiali e attrezzature richiesti ma non forniti**

1. Lettore per piastra da 96 pozzetti/strip con filtro da 550nm (540-565nm è accettabile).
2. Pipette di precisione per dispensare 10 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 1mL. Pipetta automatica per dispensare 100 $\mu$ L. Pipetta automatica per dispensare 200 $\mu$ L per il lavaggio manuale. Lavapietra automatica opzionale.
3. Dosatori cilindrici in vetro o plastica: 1 $\times$ 100mL, 1 $\times$ 400mL.
4. Contenitore di 1mL di volume.
5. Acqua distillata/deionizzata.
6. Salviette assorbenti di carta.
7. Timer per intervalli di 30 e 60 minuti.

**Preparazione del dosaggio**

Prima dell'uso, lasciar riscaldare i componenti del kit, comprese le strip di microtitolazione, fino a temperature comprese tra 18° C e 25° C per 30-60 minuti. Miscelare delicatamente i reagenti per inversione.

**Non diluire il controllo di riferimento.**

Diluire i seguenti reagenti e miscelare accuratamente.

Reagente	Volume	Aggiungere
Tampone di lavaggio concentrato	1 flaconcino	375mL di acqua distillata/deionizzata.
Diluyente per campioni 2 concentrato	1 flaconcino	100mL di acqua distillata/deionizzata.
Controlli/campioni positivi e negativi	10µL	1mL di diluyente per campioni 2 diluito

Calcolare il numero di strip di microtitolazione necessarie per il dosaggio da eseguire e porle nell'apposito supporto. Riporre le strip inutilizzate nella confezione di alluminio contenente essiccante; conservare nel sacchetto di polietilene risigillabile, a temperature comprese tra 2° C e 8° C fino al momento dell'uso. Verificare che tutte le strip siano ben salde nell'apposito supporto e che l'etichetta di identificazione del dosaggio sia affissa lungo il bordo inferiore, sotto la riga H.

**PROTOCOLLO PER IL DOSAGGIO**

1. Marcare i pozzetti per l'identificazione.
2. Dispensare con la pipetta 100µL di controllo di riferimento in duplicato, i controlli positivo e negativo prediluiti e i campioni prediluiti dei pazienti negli appositi pozzetti. Ricordarsi di cambiare il puntale della pipetta ad ogni aggiunta di volumi. Questa operazione non deve richiedere più di 15 minuti per ogni serie di controlli/campioni.
3. Incubare 60±10 minuti a 18-25° C.
4. Decantare il contenuto delle strip per inversione rapida in un lavello idoneo allo smaltimento di materiali biologici, tenendo presente il potenziale infettivo dei campioni. Asciugare le strip capovolte con salviette di carta assorbente.
5. Lavare i pozzetti tre volte con almeno 200µL di tampone di lavaggio diluito. Decantare il liquido ed asciugare i pozzetti con materiale assorbente dopo ogni lavaggio.
6. Aggiungere 100µL di coniugato IgG/IgM in ciascun pozzetto.
7. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C.
8. Ripetere le operazioni riportate ai punti 4 e 5.
9. Aggiungere 100µL di substrato in ciascun pozzetto.
10. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C. **Non decantare.**
11. Aggiungere 100µL di soluzione bloccante in ciascun pozzetto, nello stesso ordine e alla stessa velocità del substrato. Picchiettare delicatamente i pozzetti per miscelare.
12. Leggere le strip entro 24 ore a 550nm (540-565nm).

## CALCOLO E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

**Valutare ciascun saggio separatamente per calcolare e interpretare i risultati.**

Calcolare il rapporto del valore di assorbanza (densità ottica) per i controlli positivi e negativi e per ciascun campione.

$$\text{Rapporto di assorbanza} = \frac{\text{valore d'assorbanza del campione o controllo}}{\text{valore medio d'assorbanza del controllo di riferimento}}$$

Gli operatori devono calcolare il valore di normalità (punto di cut-off) tra campioni positivi e negativi, che sia specifico alla loro popolazione di pazienti. I risultati ottenuti dalle popolazioni di pazienti, adottate negli studi clinici condotti da Euro Diagnostica, suggeriscono i seguenti valori di normalità:

### Rapporto di assorbanza

<0,7

≥da 0,7 a <1,0

≥1,0

### Interpretazione dei risultati

**Negativo**

**Valore borderline: si consiglia di ripetere il test sul campione successivo**

**Positivo**

## CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Verificare che la manutenzione e calibrazione del lettore di piastre vengano eseguite in modo adeguato e in conformità alle istruzioni del costruttore, e che venga impiegata la lunghezza d'onda corretta.

Gli operatori devono accertarsi di aver compreso appieno le istruzioni per il dosaggio, in particolare per quanto concerne le avvertenze, le precauzioni e le annotazioni sulla manipolazione e la procedura.

Inoltre, prima di riferire i risultati dei test al paziente, gli operatori devono aver dimostrato di essere in grado di ottenere specifiche prestazionali, in termini di precisione e di intervallo riportabile dei risultati, equiparabili a quelle stabilite dal costruttore. Si consiglia di eseguire i controlli positivo e negativo prediluiti in duplicato per tutti i dosaggi, al fine di monitorare la qualità della procedura. Eseguire il controllo di riferimento, pronto per l'uso, in duplicato per tutti i dosaggi.

Presupponendo che le specifiche di precisione descritte dal costruttore siano soddisfatte, qualora un controllo qualsiasi non soddisfi le specifiche del rapporto di controllo riportate di seguito, il dosaggio va considerato non valido e non va riportato. L'operatore può ripetere il dosaggio, dopo aver riesaminato la procedura seguita, oppure rivolgersi al distributore o costruttore. Se il dosaggio viene ripetuto, preparare una nuova diluizione di ciascun controllo e campione. Per ciascuna serie analitica, i laboratori possono scegliere di includere i propri controlli interni. Conservare i materiali di controllo a temperature pari o inferiori a -20° C; evitare cicli di congelamento e scongelamento ripetuti. I preservanti, come l'azide di sodio a 0,1% (p/v), non incidono in alcuna misura sui risultati dei campioni.

I livelli degli analiti identificati in patologie specifiche sono quelli stabiliti dal costruttore per popolazioni specifiche, per il qual motivo è possibile che non riflettano quanto riportato nella letteratura. I livelli di incidenza, il loro rapporto con patologie specifiche, gli intervalli di riferimento e i valori di normalità appropriati devono essere calcolati per le popolazioni specifiche servite dagli operatori.

<b>Specifiche del rapporto di controllo</b>	
$\frac{\text{Assorbanza controllo positivo}}{\text{Assorbanza controllo di riferimento}}$	vedere l'etichetta del controllo positivo
$\frac{\text{Assorbanza controllo negativo}}{\text{Assorbanza controllo di riferimento}}$	<0,7

## VALORI ATTESI

169 campioni sierici, prelevati da donatori asintomatici, apparentemente sani, con anamnesi negativa di malattia autoimmune o reumatica, sono stati analizzati per gli autoanticorpi IgG e IgM anti-antigeni nucleari. La popolazione è stata raggruppata da quattro centri europei; i risultati sono stati rapportati a quelli ottenuti mediante il tradizionale metodo di immunofluorescenza, utilizzando cellule Hep-2 quale substrato. Applicando un rapporto di normalità di 0,7, si è ottenuta la seguente concordanza.

		DIASTAT®	
		+ve	-ve
IFA	+ve	1	1
	-ve	10	158

Concordanza totale = 94%.

### **Confronto con l'immunofluorescenza**

363 campioni sierici di pazienti affetti da malattia del connettivo (CTD) sono stati comparati con l'immunofluorescenza su campioni di pazienti con la stessa patologia in diversi centri europei. La positività o negatività all'IFA è stata assegnata in base ai criteri adottati dal centro di studio.

		DIASTAT®	
		+ve	-ve
IFA	+ve	204	32
	-ve	8	119

Sensibilità = 86%

Specificità = 94%

Concordanza totale = 89%.

### **Confronto con gli schemi di immunofluorescenza**

Schema IFA	n	DIASTAT ANA Positivo	% di concordanza
Centromero	35	34	97
Nucleolare/macchiettato	26	25	96
omogeneo	35	32	91
Macchiettato	61	53	87
Nucleolare	47	36	77

**Confronto con immunofluorescenza per autoanticorpi individuali**

Il saggio è stato confrontato con l'immunofluorescenza, con specificità verso autoanticorpi individuali, determinate utilizzando specifici kit ELISA DIASTAT®.

Specificità anticorpale	DIASTAT Positivo (ANA)	Positivo (IFA)	% di concordanza
Ro (SS-A)	10	10	100
La (SS-B)	6	6	100
Sm	9	9	100
Sm/RNP	20	20	100
Scl-70	38	38	100
dsDNA	15	16	94
Centromero	61	62	98
Istone	12	13	92

28 campioni, risultati Jo-1 positivi con il dosaggio ELISA anti-Jo-1 DIASTAT®, sono stati saggiati con il kit ANA DIASTAT®; i risultati ottenuti sono i seguenti:

24/28 (85,7%) positivi al test ANA.

3/28 (10,7%) entro i limiti borderline. I rispettivi rapporti erano 0,99, 0,86 e 0,78.

1/28 (3,6%) ha dato un rapporto dello 0,67.

**DATI SULLE PRESTAZIONI****Imprecisione**

- Imprecisione intradosaggio** determinata analizzando tre controlli in tre dosaggi, utilizzando tre operatori e tre lotti di kit, con otto repliche.

Controllo	Valore di assorbanza	DS	%CV
1	0,771	0,026	3,4
2	1,102	0,031	2,8
3	1,136	0,055	4,8

- Imprecisione interdosaggio** determinata analizzando sei controlli in 20 dosaggi, utilizzando tre operatori e otto lotti di kit, con quattro repliche.

Controllo	Valore di assorbanza	DS	%CV
1	0,219	0,031	14,2
2	0,273	0,031	11,4
3	0,365	0,036	9,9
4	0,521	0,036	6,9
5	1,078	0,130	12,1
6	1,012	0,131	12,9

## LIMITI D'IMPIEGO

---

1. Sebbene la presenza di titoli elevati di autoanticorpi verso questi antigeni nucleari sia indice di malattia reumatica sistemica, i dati vanno valutati alla luce di altri referti clinici e di laboratorio.
2. In alcuni soggetti possono essere presenti livelli più alti di ANA con scarsa o nessuna evidenza della patologia clinica. Per contro, in alcuni pazienti con evidenza di patologia clinica, i livelli di questi anticorpi possono essere non rivelabili.
3. Il test non identifica la specificità degli anticorpi ANA. Se un campione dà un risultato positivo, ulteriori test devono essere eseguiti al fine di determinare la specificità degli autoanticorpi.
4. Nel caso di analisi ripetute sui campioni dei pazienti, ad es. per monitoraggio, utilizzare lo stesso tipo di campione (siero o plasma EDTA) per l'intera durata del periodo di studio.

## BIBLIOGRAFIA









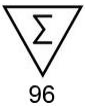


---

1. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Disease and Probes for Cell Biology. *Advances in Immunology*, **44**, 93-151, 1982.
2. Nakamura RM, Tan EM. Recent Advances in Laboratory Tests and the Significance of Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases. *Clinics in Laboratory Medicine*, **6**, 41-53, 1986.
3. Sharp GC, Irvin WS, et al. Association of Autoantibodies to Different Nuclear Antigens with Clinical Patterns of Rheumatic Disease and Responsiveness to Therapy. *J Clin Invest*, **50**, 350-359, 1971.
4. Friou GJ. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Significance and Methods. *Arthritis Rheum*, **10**, 151-159, 1967.
5. Eds. Nakamura RM, Greenwald CA, et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Advances in Laboratory Tests and Significance in Systemic Rheumatic Diseases. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1978.

## RIEPILOGO DEL PROTOCOLLO

---

1. Diluire i campioni e i controlli positivo e negativo 1:101. Non diluire il controllo di riferimento.
2. Aggiungere 100µL di controllo di riferimento in duplicato, i controlli positivo e negativo e i campioni prediluiti nei pozzetti identificati della strip di microtitolazione.
3. Incubare 60±10 minuti a 18-25° C.
4. Lavare le strip 3 volte.
5. Aggiungere 100µL di coniugato IgG/IgM in ciascun pozzetto.
6. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C.
7. Lavare le strip 3 volte.
8. Aggiungere 100µL di substrato in ciascun pozzetto.
9. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C.
10. Aggiungere 100µL di soluzione bloccante in ciascun pozzetto.
11. Leggere l'assorbanza a 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Código do lote / Lotnummer / Satsnummer
	Catalogue number / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Referência de catálogo / Bestillingsnummer / Katalognummer
	Use by / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Prazo de validade / Skal anvendes inden / Hållbar till
	Temperature limitation / Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura / Limites de temperatura / Opbevares ved / Temperaturgrænser
	Biological risks / Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung / /Rischio biologico / Risco biológico / Biologiske risici / Biologisk risk
	Consult instructions for use / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte as instruções de utilização / Læs brugsvejledning / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik / In vitro diagnostika
	Manufacturer / Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Fabricante Producent / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Contém o suficiente para "n" testes / Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Atenção / Advarsel / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro / Conformidade com In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC, Diretiva de Dispositivos Médicos / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

<b>CONJ</b>	Conjugate / Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Conjugado / Konjugat Konjugat
<b>SUBS</b>	Substrate / Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrato / Substrat / Substrat
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution / Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung / Soluzione bloccante / Solução de paragem / Stopopløsning / Stopplösning
<b>BUF WASH 16 x</b>	Wash buffer concentrate (16 X) / Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tampão de lavagem concentrado (16 X) / Vaskebufferkoncentrat (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
<b>Ag</b>	Hep-2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Hep-2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con HEp-2 / Hep-2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Hep-2 e supporto per strip / Poços revestidos com HEp-2 e suporte de tiras / Hep-2-coatede brønde og strip- holder / Hep-2-klädda brunnar och striphållare
<b>DIL SPE 5 X</b>	Sample Diluent 2 Concentrate (5 X) / Concentré 2 diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente 2 de Muestra (5 X) / Probediluent 2-Konzentrat / Diluente per campioni 2 concentrato (5 X) / Diluente de Amostras 2 concentrado (5 X) / Prøvediluent 2-koncentrat (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
<b>CONTROL REF</b>	ANA Reference Control / Témoin de référence ANA / Control de Referencia ANA / ANA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento ANA / Controllo de referência de ANAs / ANA Referencekontrol / ANA referenskontroll
<b>CONTROL +</b>	Positive Controls / Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Controlos Positivos / Positive kontrollen / Positiva kontrollen
<b>CONTROL -</b>	Negative Controls / Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Controlos Negativos / Negative kontrollen / Negativa kontrollen



---

## PORTUGUÊS: UTILIZAÇÃO PREVISTA

---

O teste de anticorpos antinucleares (ANA) DIASTAT<sup>®</sup> é um ensaio imunoenzimático (ELISA) qualitativo para a detecção de ANAs no soro humano ou em plasma humano com EDTA. Detecta ANAs contra os antígenos Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), dsDNA, histona e centrómero.

O ensaio pode ser utilizado como teste de rastreio para eliminar amostras que são negativas para todos os ANAs. As amostras que dão um resultado positivo devem ser novamente analisadas para identificar o anticorpo ou os anticorpos presentes, específicos de um antígeno. Existem kits de ELISA quantitativos e qualitativos para a detecção individual de ANAs anti-Sm, anti-Sm/RNP, anti-Ro (SS-A), anti-La (SS-B), anti-Scl-70, anti-Jo-1, anti-dsDNA e anti-centrómero. Existem kits qualitativos para a detecção individual de Scl-70 e Jo-1. A detecção de ANAs representa um parâmetro num processo de diagnóstico de critérios múltiplos.

---

## INTRODUÇÃO

---

As doenças reumáticas sistémicas são doenças auto-imunes como o lúpus eritematoso disseminado e as variantes do lúpus e a polimiosite, síndrome de Sjögren, esclerodermia, doença mista do tecido conjuntivo, CREST e artrite reumatóide. Uma característica geral das doenças reumáticas sistémicas consiste na presença de anticorpos circulantes contra uma diversidade de antígenos celulares. A detecção e a caracterização serológica de auto-anticorpos específicos desempenham um papel importante no diagnóstico diferencial destas doenças.

Os auto-anticorpos contra os antígenos nucleares (ANAs) são um grupo de anticorpos com especificidade para antígenos nucleares, incluindo os antígenos Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, dsDNA, histona e do centrómero. Um ensaio de ANAs com um resultado positivo proporciona uma evidência presuntiva de doença reumática sistémica<sup>1,2</sup>; uma definição adicional de perfis de anticorpos específicos é um auxiliar valioso no processo de diagnóstico. Estão disponíveis várias técnicas para a detecção de ANAs incluindo hemaglutinação, imunodifusão e imunofluorescência indirecta<sup>3,4,5</sup>. Estes métodos de análise têm desvantagens inerentes como a falta de sensibilidade e reprodutibilidade e não são adequados para a análise de grandes lotes. Os ensaios ELISA oferecem sensibilidade, reprodutibilidade, objectividade por comparação com outros métodos e flexibilidade de análise em função do tamanho de lotes.

O ensaio DIASTAT<sup>®</sup> detecta anticorpos IgG e IgM totais contra os antígenos nucleares extraíveis Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, dsDNA, histona e do centrómero. Também detecta auto-anticorpos séricos que produzem padrões homogêneos, do centrómero e mosqueados/nucleolares pelos métodos convencionais de IFA. O ensaio ELISA DIASTAT<sup>®</sup> constitui um teste de rastreio de primeira linha, apropriado para anticorpos totais. Um resultado negativo diminui, mas não exclui, a probabilidade de doença reumática sistémica. Os resultados positivos devem ser ulteriormente analisados para identificar os auto-anticorpos específicos presentes.





---

## PRINCÍPIO DO ENSAIO

---

Os poços das tiras de microtitulação são revestidos por extracto de células HEp-2 altamente purificado. Durante a primeira incubação, os ANAs específicos, em soro ou plasma com EDTA diluído, ligam-se à superfície revestida com o antígeno. Os poços são depois lavados para remover os componentes não ligados. Na segunda incubação, o Conjugado, anticorpos anti-IgG e anti-IgM humanas marcados com enzima, liga-se a quaisquer auto-anticorpos ligados à superfície. Após nova lavagem, os auto-anticorpos específicos são marcados por incubação com o Substrato. A adição da Solução de Paragem termina a reacção, dando origem a um produto final corado. A quantidade de Conjugado ligado é medida em unidades de absorbância e comparada com a quantidade ligada pelo Controlo de Referência.

## COMPONENTES DO KIT

<b>A</b>	Conjugado IgG/IgM	1 x 15 ml	Anticorpos anti-IgG e IgM humanas marcados com fosfatase alcalina, tampão Tris, estabilizador de proteínas, azida sódica <0,1% (p/v). <b>Pronto a utilizar.</b>	
<b>B</b>	Substrato	1 x 15 ml	Mg <sup>2+</sup> , monofosfato de fenolftaleína (PMP), solução tampão. <b>Pronto a utilizar.</b> Não expor à luz durante a conservação.	
<b>C</b>	Solução de Paragem	1 x 15 ml	Hidróxido de sódio, EDTA, tampão carbonato (pH > 10). <b>Pronto a utilizar.</b>	
<b>D</b>	Tampão de Lavagem concentrado (16x)	2 x 25 ml	Tampão borato, azida sódica a 0,4% (p/v). <b>Diluir antes de utilizar.</b>	
<b>E</b>	Poços revestidos com HEp-2 e Suporte de tiras	Tiras de microtitulação com 12 x 8 poços	Revestidos com extracto de células HEp-2 e acondicionados em embalagem de folha de alumínio, que pode ser novamente selada, com exsicante.	
<b>F</b>	Diluyente de Amostras 2 concentrado (5x)	1 x 25 ml	Tampão fosfato, estabilizador de proteínas, Triton X-100 a 5% (p/v), azida sódica a 0,5% (p/v). <b>Diluir antes de utilizar.</b>	
<b>6</b>	Controlo de Referência de ANAs	1 x 1,5 ml	Plasma humano, tampão, azida sódica < 0,1% (p/v). <b>Pronto a utilizar.</b>	
<b>+/-</b>	Controlo positivo Controlo negativo	1 x 0,2 ml 1 x 0,1 ml	Plasma humano, azida sódica < 0,1% (p/v). <b>Diluir a 1:101 com Diluyente de amostras 2 diluído, antes de utilizar, como com as amostras.</b>	
	Folheto informativo			

## CONSERVAÇÃO DE REAGENTES

### *Estabilidade do kit aberto*

Um kit foi aberto e reutilizado em três ocasiões durante um período de três meses sem efeitos adversos sobre o desempenho do kit.

### *Observações sobre o manuseamento e procedimento*

1. Conservar os componentes do kit a 2°C-8°C e utilizar até ao prazo de validade indicado nos rótulos. Não utilizar reagentes cujo prazo de validade expirou.
2. Não misturar lotes de números diferentes.
3. Não congelar kits.
4. O Tampão de Lavagem concentrado, Diluyente de Amostras 2 concentrado e os Controlos Positivo e Negativo devem ser diluídos antes de serem utilizados. Todos os outros reagentes estão prontos a utilizar.
5. O Tampão de Lavagem diluído e o Diluyente de Amostras 2 diluído são estáveis a 2°C-8°C até 6 meses se for evitada a contaminação microbiana.
6. Tornar a colocar as tiras de microtitulação excedentes na embalagem de folha de alumínio e conservar com o exsicante a 2°C-8°C, até serem novamente necessárias.
7. Não expor o Substrato à luz durante a conservação.
8. Evitar a contaminação dos reagentes. Utilizar uma nova ponta de pipeta descartável para cada reagente ou manipulação de amostras.

### *Sinais de deterioração*

O Substrato deve ter uma cor amarelo claro. Uma cor rósea indica contaminação e o reagente deve ser eliminado. Turbidez ou precipitação em qualquer reagente indica deterioração e o componente deve ser eliminado.

### **Colheita e conservação de amostras**

O ensaio é recomendado para amostras de soro ou de plasma com EDTA; não utilizar amostras lipémicas, hemolisadas ou turvas. Misturar muito bem as amostras descongeladas antes do ensaio e evitar a congelação/descongelação repetida. Não inactivar as amostras pelo calor, porque podem produzir resultados falsos positivos.

As amostras podem ser conservadas a temperatura igual ou inferior a -20°C ou analisadas no período de 12 horas após a colheita.

## **ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES**

### **Apenas para uso em diagnóstico in vitro.**

#### **Precauções de segurança**

1. Aderir rigorosamente às instruções que constam deste folheto, especialmente no que respeita às condições de manuseamento e conservação.
2. Os Controlos contêm plasma humano testado por ensaios aprovados pela FDA para a detecção de antigénio de superfície da hepatite B, VHC, antigénio VIH e anticorpos VIH, tendo-se concluído que são negativos e não reactivos. Como não existe nenhum teste que ofereça uma garantia absoluta da ausência de agentes infecciosos, os Controlos devem ser considerados potencialmente infecciosos e manuseados com as mesmas precauções que são utilizadas com qualquer material que constitui um risco biológico potencial. O Manual de Saúde "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" do CDC/NIH, 3.<sup>a</sup> edição, 1993, descreve como se devem manusear estes materiais em conformidade com as Boas Práticas Laboratoriais. Estas directrizes são aplicáveis nos Estados Unidos.
3. Não pipetar com a boca.
4. Não fumar, comer, beber ou aplicar cosméticos em áreas onde são manuseados kits e amostras.
5. Qualquer afecção da pele, corte, escoriação ou outras lesões cutâneas, deve ser devidamente protegida.
6. Os Controlos, o Conjugado, o Diluente de Amostras 2 concentrado e o Tampão de Lavagem concentrado contêm azida sódica que pode reagir com a canalização de chumbo e de cobre e formar azidas de metal altamente explosivas. Ao eliminar, drenar com água em abundância para prevenir a acumulação de azidas.
7. A Solução de Paragem contém hidróxido de sódio. Evitar o contacto com a pele, olhos e membranas mucosas. Os derrames devem ser limpos com uma quantidade abundante de água. Se ocorrer contacto com a pele ou olhos, irrigar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista.
8. O substrato contém PMP, Bronidox L e Dietanolamina. Evitar o contacto com a pele, olhos e sistema respiratório. Se ocorrer contacto com a pele, olhos ou sistema respiratório, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista.
9. As fichas dos dados de segurança do material relativas a todos os componentes perigosos incluídos neste kit estão disponíveis sob pedido junto da Euro Diagnostica.



**Atenção**

**B.**

SUBS

Contém: Dietanolamina

H319:	Provoca irritação ocular grave.
P264:	Lavar as mãos cuidadosamente após manuseamento.
P280:	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P305+P351+P338:	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
P337+P313:	Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

**Atenção****C.**

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

Contém: Hidróxido de sódio

- H315: Provoca irritação cutânea.  
 H319: Provoca irritação ocular grave.  
 P264: Lavar as mãos cuidadosamente após manuseamento.  
 P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.  
 P302+P352: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes.  
 P305+P351+P338: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.  
 P332+P313: Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.  
 P337+P313: Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

**Atenção****D. and F.**

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Contém: Azida sódica

- H302: Nocivo por ingestão.  
 EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.  
 H412: Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.  
 P264: Lavar as mãos cuidadosamente após manuseamento.  
 P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.  
 P301+P312: EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.  
 P273: Evitar a libertação para o ambiente.

## PREPARAÇÃO

### ***Materiais/Equipamento necessários mas não fornecidos***

1. Leitor de microplacas/tiras com 96 poços com um filtro de 550 nm (é aceitável 540-565 nm).
2. Pipetas de precisão para dispensar 10 µl, 100 µl, 1 ml. Pipeta automática para dispensar 100 µl. Pipeta automática para dispensar 200 µl para lavagem manual, lavador de microplacas automático opcional.
3. Copos graduados de vidro/plástico: 1 de 100 ml, 1 de 400 ml.
4. Recipientes com o volume de 1 ml
5. Água destilada/desionizada.
6. Toalhetes de papel.
7. Temporizador para intervalos de 30 minutos e 60 minutos.

**Preparação para o ensaio**

Deixar que todos os componentes do kit, incluindo as tiras de microtitulação, atinjam 18°C-25°C durante 30 a 60 minutos antes de utilizar. Misturar os reagentes invertendo cuidadosamente.

**Não diluir o Controlo de Referência.**

Diluir os seguintes reagentes e misturar muito bem.

Reagente	Volume	Adicionar
Tampão de Lavagem concentrado	1 frasco	375 ml de água destilada/desionizada.
Diluyente de Amostras 2 concentrado	1 frasco	100 ml de água destilada/desionizada.
Controlos Positivo e Negativo/amostras	10 µl	1 ml de Diluyente de Amostras 2 diluído

Calcular o número de tiras de microtitulação que é necessário para o presente ensaio e colocá-las no suporte de tiras de microtitulação. Tornar a colocar as tiras de microtitulação excedentes na embalagem de folha de alumínio com o exsicante e conservar no saco de plástico selado a 2°C-8°C, até serem necessárias. Certificar-se de que todas as tiras estão bem seguras no suporte das tiras de microtitulação e que a etiqueta de identificação do ensaio está colocada no bordo inferior por baixo da fila H.

**PROTOCOLO DO ENSAIO**

- Poços de referência para identificação.
- Pipetar em duplicado 100 µl de Controlo de Referência, dos Controlos Positivo e Negativo pré-diluídos e das amostras do doente pré-diluídas nos poços apropriados. Não esquecer de mudar as pontas das pipetas entre cada adição. Esta etapa não deve exceder 15 minutos para cada conjunto de Controlos/amostras.
- Incubar durante 60±10 minutos a 18°C-25°C.
- Decantar o conteúdo das tiras por inversão rápida numa banca adequada para a eliminação de materiais biológicos, tendo em atenção o risco infeccioso potencial das amostras. Absorver os poços das tiras invertidas com os toalhetes de papel.
- Lavar os poços **três vezes** com um mínimo de 200 µl de Tampão de Lavagem diluído. **Decantar e absorver após cada passo.**
- Adicionar 100 µl do Conjugado IgG/IgM em cada poço.
- Incubar durante 30±5 minutos a 18°C-25°C.
- Repetir os passos 4 e 5.
- Adicionar 100 µl de Substrato em cada poço.
- Incubar durante 30±5 minutos a 18°C-25°C. **Não decantar.**
- Adicionar 100 µl de Solução de Paragem em cada poço, na mesma ordem e rapidez utilizadas com o Substrato. Bater suavemente nos poços para misturar.
- Ler as tiras em menos de 24 horas num comprimento de onda de 550 nm (540-565 nm).

## CÁLCULO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

### Considerar cada ensaio em separado durante o cálculo e interpretação dos resultados

Calcular a razão dos valores da absorbância (densidade óptica) dos Controlos Positivo e Negativo e de cada amostra.

$$\text{Razão da absorbância} = \frac{\text{Valor da absorbância do controlo ou da amostra}}{\text{Valor da absorbância média do Controlo de Referência}}$$

Os utilizadores devem calcular um valor limiar (*cut-off*) entre amostras positivas e negativas que seja específico das suas populações de doentes. Os resultados das populações de doentes utilizados no ensaio clínico da Euro Diagnostica sugerem o seguinte valor limiar:

<u>Razão da absorbância</u>	<u>Interpretação dos resultados</u>
<0,7	Negativo
≥0,7 a <1,0	Limite - recomenda-se a repetição do ensaio nas amostras seguintes
≥1,0	Positivos

## CONTROLO DE QUALIDADE

Certificar-se de que a manutenção e calibração adequadas do leitor de microplacas são efectuadas de acordo com as instruções do fabricante e que é utilizado o comprimento de onda correcto.

Os utilizadores devem assegurar-se de que estão totalmente familiarizados com as instruções do ensaio, especialmente com as secções “Advertências e Precauções” e “Observações sobre o manuseamento e procedimento”. Os utilizadores devem demonstrar que podem obter especificações de desempenho relativas à precisão e ao intervalo comunicável dos resultados do ensaio que sejam comparáveis com as estabelecidas pelo fabricante, antes de comunicar os resultados do ensaio do doente. Recomenda-se que os Controlos Positivo e Negativo pré-diluídos sejam analisados em duplicado em todos os ensaios para monitorizar a qualidade do procedimento de ensaio. Analisar em duplicado o Controlo de Referência pronto a utilizar em todos os ensaios.

Presumindo que as especificações de precisão descritas pelo fabricante são satisfeitas, a não concordância de qualquer um dos Controlos com as especificações da razão dos Controlos abaixo indicadas invalida o ensaio e os resultados dos doentes não devem ser comunicados. O analista pode repetir o ensaio, após ter revisto o respectivo procedimento, ou pode contactar o distribuidor ou o fabricante. Caso repita o ensaio, deve preparar uma nova diluição de cada Controlo e amostra. Os laboratórios podem querer incluir controlos internos em cada série do ensaio. Conservar este material de controlo a temperatura igual ou inferior a -20°C e evitar repetir ciclos de congelação/descongelação.

Os conservantes como a azida de sódio a 0,1% (p/v) não afectam os resultados das amostras.

Os níveis de analitos identificados em doenças específicas são os que foram estabelecidos pelo fabricante para populações específicas e não reflectem necessariamente o que está descrito em publicações. Os níveis de incidência, a sua relação com doenças específicas, os intervalos de referência e os valores limiares apropriados devem ser todos calculados para as populações específicas analisadas pelos utilizadores.

<b>Especificações da Razão dos Controlos</b>	
$\frac{\text{Absorbância do Controlo Positivo}}{\text{Absorbância do Controlo de Referência}}$	ver rótulo do Controlo Positivo
$\frac{\text{Absorbância do Controlo de Negativo}}{\text{Absorbância do Controlo de Referência}}$	<0,7

## VALORES PREVISTOS

Analisaram-se 169 amostras de soro de doadores saudáveis, aparentemente assintomáticos, sem antecedentes de doenças auto-imunes ou reumáticas, para detecção de auto-anticorpos IgG e IgM contra antígenos nucleares. Esta população foi reunida em quatro centros europeus; os resultados foram comparados em relação a um método convencional de imunofluorescência utilizando células HEp-2 como substrato. Utilizando um valor limiar de 0,7, obteve-se a seguinte concordância.

		DIASTAT	
		+vo	-vo
IFA	+vo	1	1
	-vo	10	158

Concordância global = 94%

### *Comparação com Imunofluorescência*

Trezentas e sessenta e três (363) amostras de soros de doentes com doença do tecido conjuntivo foram comparadas com imunofluorescência efectuada em amostras de doentes com doença do tecido conjuntivo, em vários centros europeus. A positividade ou negatividade obtida com IFA foi atribuída de acordo com os critérios do centro de ensaio.

		DIASTAT	
		+vo	-vo
IFA	+vo	204	32
	-vo	8	119

Sensibilidade = 86%

Especificidade = 94%

Concordância global = 89%

### *Comparação com padrões de imunofluorescência*

Padrão obtido com IFA	n	DIASTAT ANA Positivo	% de concordância
Centrómero	35	34	97
Nucleolar/Mosqueado	26	25	96
Homogéneo	35	32	91
Mosqueado	61	53	87
Nucleolar	47	36	77

**Comparação com Imunofluorescência utilizando os auto-anticorpos individuais**

O ensaio foi comparado com imunofluorescência, utilizando as especificidades dos auto-anticorpos individuais. Estas foram determinadas utilizando os kits de ELISA DIASTAT® específicos.

Especificidade do anticorpo	DIASTAT positivo (ANA)	Positivo (IFA)	% de concordância
Ro (SS-A)	10	10	100
La (SS-A)	6	6	100
Sm	9	9	100
Sm/RNP	20	20	100
Scl-70	38	38	100
dsDNA	15	16	94
Centrómero	61	62	98
Histona	12	13	92

As 28 amostras que foram identificadas como Jo-1 positivas utilizando o kit ELISA DIASTAT® anti-Jo-1 foram analisadas utilizando o kit DIASTAT® ANA com os seguintes resultados:

24/28 (85,7%) foram positivas no ensaio para detecção de ANAs.

3/28 (10,7%) estavam situadas na área limite. As respectivas razões foram de 0,99, 0,86 e 0,78.

1/28 (3,6%) deu uma razão de 0,67.

**CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO****Imprecisão**

- Imprecisão intra-ensaio** determinada analisando três controlos em três ensaios, utilizando três analistas e três lotes do kit, com replicação de oito.

Controlo	Valor da absorbância	DP	%CV
1	0,771	0,026	3,4
2	1,102	0,031	2,8
3	1,136	0,055	4,8

- Imprecisão inter-ensaio** determinada analisando seis controlos em 20 ensaios, utilizando três analistas e oito lotes do kit, com replicação de quatro.

Controlo	Valor da absorbância	DP	%CV
1	0,219	0,031	14,2
2	0,273	0,031	11,4
3	0,365	0,036	9,9
4	0,521	0,036	6,9
5	1,078	0,130	12,1
6	1,012	0,131	12,9



---

## LIMITAÇÕES DE UTILIZAÇÃO

---

1. Embora a presença de títulos elevados de auto-anticorpos contra os antígenos nucleares seja indicativa de doença reumática sistêmica, os dados devem ser considerados no contexto de outras observações clínicas e laboratoriais.
2. Alguns indivíduos podem ter níveis elevados de ANAs com pouca ou nenhuma evidência de doença clínica. Por outro lado, alguns doentes com sinais de doença clínica podem ter níveis não detectáveis destes anticorpos.
3. O ensaio não identifica a especificidade de um anticorpo antinuclear (ANA). Se uma amostra der um resultado positivo deverão ser efectuados outros ensaios para determinar a especificidade dos auto-anticorpos.
4. No caso de uma amostragem repetida de um doente, por exemplo para monitorização, deve ser utilizado o mesmo tipo de amostra (soro ou plasma com EDTA) durante todo o período de estudo.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---









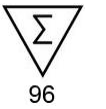


1. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Disease and Probes for Cell Biology. *Advances in Immunology*, **44**, 93-151, 1982.
2. Nakamura RM, Tan EM. Recent Advances in Laboratory Tests and the Significance of Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases. *Clinics in Laboratory Medicine*, **6**, 41-53, 1986.
3. Sharp GC, Irvin WS, et al. Association of Autoantibodies to Different Nuclear Antigens with Clinical Patterns of Rheumatic Disease and Responsiveness to Therapy. *J Clin Invest*, **50**, 350-359, 1971.
4. Friou GJ. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Significance and Methods. *Arthritis Rheum*, **10**, 151-159, 1967.
5. Eds. Nakamura RM, Greenwald CA, et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Advances in Laboratory Tests and Significance in Systemic Rheumatic Diseases. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1978.

---

## RESUMO DO PROTOCOLO

---

1. Diluir as amostras e os Controlos Positivo e Negativo a 1:101. Não diluir o Controlo de Referência.
2. Adicionar em duplicado 100 µl de Controlo de Referência, dos Controlos Positivo e Negativo pré-diluídos e das amostras do doente pré-diluídas nos poços especificados da tira de microtitulação.
3. Incubar durante 60±10 minutos a 18°C-25°C.
4. Lavar as tiras 3 vezes.
5. Adicionar 100 µl do Conjugado IgG/IgM em cada poço.
6. Incubar durante 30±5 minutos a 18°C-25°C.
7. Lavar as tiras 3 vezes.
8. Adicionar 100 µl de Substrato em cada poço.
9. Incubar durante 30±5 minutos a 18°C-25°C.
10. Adicionar 100 µl de Solução de Paragem em cada poço.
11. Ler a absorbância a 550 nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Código do lote / Lotnummer / Satsnummer
	Catalogue number / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Referência de catálogo / Bestillingsnummer / Katalognummer
	Use by / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Prazo de validade / Skal anvendes inden / Hållbar till
	Temperature limitation / Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura / Limites de temperatura / Opbevaes ved / Temperaturgrænser
	Biological risks / Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung / /Rischio biologico / Risco biológico / Biologiske risici / Biologisk risk
	Consult instructions for use / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte as instruções de utilização / Læs brugsvejledning / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik / In vitro diagnostika
	Manufacturer / Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Fabricante / Producent / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Contém o suficiente para "n" testes / Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Atenção / Advarsel / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro / Conformidade com In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC, Diretiva de Dispositivos Médicos / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

<b>CONJ</b>	Conjugate / Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Conjugado / Konjugat Konjugat
<b>SUBS</b>	Substrate / Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrato / Substrat / Substrat
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution / Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung / Soluzione bloccante / Solução de paragem / Stopopløsning / Stopplösning
<b>BUF WASH 16 x</b>	Wash buffer concentrate (16 X) / Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tampão de lavagem concentrado (16 X) / Vaskebufferkoncentrat (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
<b>Ag</b>	Hep-2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Hep-2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con HEp-2 / Hep-2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Hep-2 e supporto per strip / Poços revestidos com HEp-2 e suporte de tiras / Hep-2-coatede brønde og strip- holder / Hep-2-klädda brunnar och striphållare
<b>DIL SPE 5 X</b>	Sample Diluent 2 Concentrate (5 X) / Concentré 2 diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente 2 de Muestra (5 X) / Probediluens 2-Konzentrat / Diluente per campioni 2 concentrato (5 X) / Diluente de Amostras 2 concentrado (5 X) / Prøvediluent 2-koncentrat (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
<b>CONTROL REF</b>	ANA Reference Control / Témoin de référence ANA / Control de Referencia ANA / ANA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento ANA / Controllo de referência de ANAs / ANA Referencekontrol / ANA referenskontroll
<b>CONTROL +</b>	Positive Controls / Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Controlos Positivos / Positive kontrollen / Positiva kontrollen
<b>CONTROL -</b>	Negative Controls / Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Controlos Negativos / Negative kontrollen / Negativa kontrollen

## DANSK: TILSIGTET BRUG

DIASTAT<sup>®</sup> antinukleær antistof (ANA) test er en kvalitativ enzymkoblet immunosorbentanalyse (ELISA) til påvisning af ANA'er i human serum eller EDTA plasma. Den påviser ANA'er rettet mod Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, dsDNA, histon og centromer antigener.

Testen kan bruges til at udscreene prøver, der er negative for alle ANA'er. Prøver, der giver et positivt testresultat, skal testes yderligere for at identificere det/de antigen-specifikke antistof(fer), der er tilstede. Kvantitative/Kvalitative ELISA kits er tilgængelige til den individuelle påvisning af Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), dsDNA og centromer ANA'er. Kvalitative kits er tilgængelige til den individuelle påvisning af Scl-70 og Jo-1. ANA påvisning udgør et parameter i en multikriterium diagnostisk proces.

## INTRODUKTION

Systemiske rheumatiske sygdomme er autoimmune lidelser, som fx systemisk lupus erythematosus (SLD) og lupus varianter, polymyositis, Sjögrens syndrom, scleroderma og blandet bindevævssygdom (MCTD), CREST og reumatoid arthritis. En generel karakteristik af systemiske rheumatiske sygdomme er tilstedeværelsen af cirkulerende antistoffer rettet mod forskellige cellulære antigener. Påvisning og serologisk karakterisering af specifikke autoantistoffer spiller en vigtig rolle i differentialdiagnosticeringen af disse sygdomme.





Autoantistofferet rettet mod nukleærantigener (ANA'er) er en gruppe antistoffer, der er specifikke for nukleærantigener, heriblandt Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, dsDNA, histon og centromer antigener. Et positivt ANA testresultat giver et sandsynligt bevis for systemisk reumatisk sygdom<sup>1,2</sup>; yderligere definition af specifikke antistofprofiler er en værdifuld hjælp i den diagnostiske proces. En række teknikker er tilgængelige for ANA påvisning, heriblandt hæmagglutination, immunodiffusion og indirekte immunofluorescens<sup>3,4,5</sup>. Disse tests har iboende ulemper – mangel på sensitivitet og reproducérbarhed og de er ubehørlige for test af store batches. ELISA'er tilbyder sensitivitet, reproducérbarhed, objektivitet i forhold til andre metoder og fleksibilitet med hensyn til batch-størrelser.

DIASTAT<sup>®</sup> testen påviser samlede IgG og IgM antistoffer rettet mod de ekstraherbare nukleærantigener Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, dsDNA, histon og centromer antigener. Den påviser ligeledes serumautoantistoffer, der producerer homogene, centromere og plettede/nukleolære mønstre i konventionel IFA testning. DIASTAT<sup>®</sup> ELISA er en behørlig første linje screen for total antistof. Et negativt resultat reducerer, men udelukker ikke, sandsynligheden for systemisk reumatisk sygdom. Positive resultater skal analyseres yderligere for at identificere de specifikke autoantistoffer, der er tilstede.

## ANALYSEPRINCIP

Mikrotiter strips-brøndene er coated med højrenset HEp-2 celleekstrakt. Under den første inkubation vil specifikke ANA'er i fortyndet serum eller EDTA plasma binde sig til den antigencoatede overflade. Brøndene vaskes derefter for at fjerne ubundne komponenter. I den anden inkubation binder Konjugatet, enzym-mærkede antistoffer rettet mod human IgG og IgM, eventuelle overfladebundne autoantistoffer. Efter endnu en vask spores specifikke autoantistoffer ved inkubation med Substratet. Tilsætning af Stopopløsning afbryder reaktionen, der resulterer i et farvet slutprodukt. Mængden af bundet Konjugat måles i absorbansenheder og sammenlignes med det, der bindes af Referencekontrollen.

## KITKOMPONENTER

<b>A</b>	IgG/IgM Konjugat	1 x 15ml	Alkalisk fosfatase-mærkede antistoffer rettet mod humant IgG og IgM, Trisbuffer, proteinstabilisator, <0,1% (w/v) natriumazid. <b>Klar til brug.</b>	
<b>B</b>	Substrat	1 x 15ml	Mg <sup>2+</sup> , phenolphthalein monophosphat (PMP), bufferopløsning. <b>Klar til brug.</b> Må ikke udsættes for lys under opbevaring.	
<b>C</b>	Stopopløsning	1 x 15ml	Natriumhydroxid, EDTA, carbonatbuffer (pH >10). <b>Klar til brug.</b>	
<b>D</b>	Vaskebuffer-koncentrat (16X)	2 x 25ml	Boratbuffer, 0,4% (w/v) natriumazid. <b>Fortynd før brug.</b>	
<b>E</b>	HEp-2-coatede brønde og strip-holder	12 x 8 brønds mikrotiter strips	Coated med HEp-2 celleekstrakt, i en genlukkelig foliepakke med tørremiddel.	
<b>F</b>	Prøvediluent 2-koncentrat (5X)	1 x 25ml	Phosphatbuffer, proteinstabilisator, 5% (v/v) Triton X-100, 0,5% (w/v) natriumazid. <b>Fortynd før brug.</b>	
<b>6</b>	ANA Referencekontrol	1 x 1,5ml	Humant plasma, buffer, <0,1% (w/v) natriumazid. <b>Klar til brug.</b>	
<b>+/-</b>	Positiv Kontrol Negativ Kontrol	1 x 0,2ml 1 x 0,1ml	Humant plasma, <0,1% (w/v) natriumazid. <b>Fortynd 1:101 med Prøvediluent 2 før brug, som for prøver.</b>	
	Indlægsseddel			

## OPBEVARING AF REAGENSER

### Åbnet kit-stabilitet

Et kit blev åbnet og genbrugt ved tre lejligheder over en tre måneders periode uden nogen negativ effekt på kittets ydeevne.

### Håndterings- og proceduremæssige bemærkninger

1. Kitkomponenter skal opbevares ved 2-8°C og bruges inden udløbsdatoen på etiketten. Man må ikke bruge ikke reagenser efter disses udløbsdato.
2. Man må ikke blande forskellige lotnumre.
3. Kit må ikke nedfryses.
4. Vaskebufferkoncentrat, Prøvediluent 2-koncentrat og Positive og Negative kontroller skal fortyndes før brug. Alle andre reagenser er klar til brug.
5. Fortyndet Vaskebuffer og fortyndet Prøvediluent 2 er stabile ved 2-8° C i op til 6 måneder, hvis mikrobiel kontaminering undgås.
6. Put overskydende mikrotiter strips tilbage i foliepakken og opbevar dem med tørremiddel ved 2-8° C indtil de skal bruges.
7. Substratet må ikke udsættes for lys under opbevaring.
8. Undgå kontaminering af reagenser. Brug en ny engangspipettespids for hver reagens eller prøvehåndtering.

### Indikationer på forringelse

Substratet skal være lysegult. Pinkfarvning er tegn på kontaminering og reagensen skal bortskaffes. Uklarhed eller udfældning i enhver komponent er tegn på forringelse og komponenten skal bortskaffes.

**Prøvetagning og opbevaring**

Analysen anbefales for serum/EDTA plasma-prøver; der må ikke bruges lipæmiske, hæmolyserede eller uklare prøver. Optøede prøver skal blandes grundigt, før analysen udføres og gentagen nedfrysning/optøning skal undgås. Prøver må ikke varme-inaktiveres, da det kan give falsk-positive resultater.

Prøver kan opbevares ved eller under  $-20^{\circ}\text{C}$ , eller analyseres inden for 12 timer efter indsamling.

**ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER****Kun til in vitro diagnostisk brug.****Sikkerhedsforanstaltninger**

1. Vejledningen på denne indlægsseddel skal følges nøje, især i forbindelse med håndterings- og opbevaringsbetingelser.
2. Kontroller indeholder humant plasma, der er blevet testet med FDA-godkendte analyser for hepatitis B overfladeantigen, HCV, HIV antigen og HIV antistoffer, og fundet at være ikke-reaktive/negative. Da der ikke er nogen kendte tests, der kan give fuldstændig forsikring for, at der ikke er nogen infektiøse agenser til stede, skal Kontroller anses som potentielt infektiøse og håndteres med de samme forholdsregler som alt andet potentielt biologisk farligt materiale. CDC/NIH arbejdsmiljø- og sundhedsmanualen "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3rd edition, 1993, beskriver, hvordan disse materialer skal håndteres i overensstemmelse med god laboratoriepraksis. Dette gælder for USA.
3. Der må ikke pipetteres med munden.
4. Der må hverken ryges eller indtages mad- eller drikkevarer eller påføres kosmetik på områder, hvor kits og prøver håndteres.
5. Eventuelle hudlidelser, snitsår, afskrabninger og andre hudlæsioner skal beskyttes på passende måde.
6. Kontroller, Konjugat, Prøvediluent 2-koncentrat og Vaskebufferkoncentrat indeholder natriumazid, der kan reagere med bly- og kobbervandrør og danne højeksplosive metalazider. Ved bortskaffelse skal der skylles med store mængder vand for at forhindre ophobning af azid.
7. Stopopløsningen indeholder natriumhydroxid. Undgå kontakt med hud, øjne og slimhinder. Spild skal vaskes af med masser af vand og tørres op. Hvis kontakt med hud eller øjne forekommer, skal der omgående skylles med vand og søges lægehjælp.
8. Substratet indeholder PMP, Bronidox L og Diethanolamin. Undgå kontakt med hud, øjne og åndedrætssystem. Hvis kontakt med hud, øjne eller åndedrætssystem forekommer, skal der skylles med vand og læge skal kontaktes.
9. Materiale-sikkerhedsdatablade for alle farlige komponenter i dette kit fås ved anmodning fra Euro Diagnostica.

**Advarsel****B.**

SUBS

Indeholder: Diethanolamin

H319:	Forårsager alvorlig øjenirritation.
P264:	Vask hænderne grundigt efter håndtering.
P280:	Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ ansigtsbeskyttelse.
P305+P351+P338:	VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.
P337+P313:	Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp.

**Advarsel****C.**

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

Indeholder: Natriumhydroxid

H315:	Forårsager hudirritation.
H319:	Forårsager alvorlig øjenirritation.
P264:	Vask hænderne grundigt efter håndtering.
P280:	Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.
P302+P352:	VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt sæbe og vand.
P305+P351+P338:	VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.
P332+P313:	Ved hudirritation: Søg lægehjælp.
P337+P313:	Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp.

**Advarsel****D. and F.**

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Indeholder: Natriumazid

H302:	Farlig ved indtagelse.
EUH032:	Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre.
H412:	Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.
P264:	Vask hænderne grundigt efter håndtering.
P280:	Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.
P301+P312:	I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: I tilfælde af ubehag ring til en GIFTINFORMATION eller en læge.
P273:	Undgå udledning til miljøet.

## KLARGØRING

### **Nødvendige materialer/udstyr, der ikke medfølger**

1. 96 brønds plade/strip-læser med 550nm filter (540-565nm er acceptabelt).
2. Præcisionspipetter til dispensering af 10µl, 100µl, 1ml. Automatpipette til dispensering af 100µl. Automatpipette til dispensering af 200µl til manuel vask, valgfri brug af automatiseret pladevaskeapparat.
3. Glas/plastik målebægre: 1x100ml, 1x400ml.
4. 1ml volumen-beholdere.
5. Destilleret/demineraliseret vand.
6. Papierservietter.
7. Timer til 30 og 60 minutters intervaller.

**Klargøring til analyse**

Lad alle kitkomponenter, inklusiv mikrotiter strips, varme op til 18-25° C i 30-60 minutter før brug. Bland reagenser ved forsigtigt at vende op og ned på dem.

**Referencekontrollen skal ikke fortyndes.**

Fortynd de følgende reagenser og bland dem grundigt.

Reagens	Volumen	Tilsæt
Vaskebufferkoncentrat	1 hætteglas	375ml destilleret/demineraliseret vand
Prøvediluent 2-koncentrat	1 hætteglas	100ml destilleret/demineraliseret vand
Positive og Negative Kontroller/prøver	10µl	1ml fortyndet Prøvediluent 2

Beregn antallet af mikrotiter strips, der er påkrævet for den aktuelle analyse, og behold disse i mikrotiter strip-holderen. Put overskydende strips tilbage i foliepakken med tørremidlet og opbevar dem i den genlukkelige plastpose ved 2-8°C, indtil de skal bruges. Tjek at alle strips sidder helt fast i mikrotiter strip-holderen og at analyse-identifikationsfanen ligger langs den nederste kant under række H.

**ANALYSEPROTOKOL**

1. Referencebrønde til identifikation.
2. Pipetter 100µl Referencekontrol i duplikat, fortyndede Positive og Negative Kontroller og fortyndede patientprøver i de behørigte brønde. Husk at skifte pipettespidser mellem tilsætninger. Dette trin skulle ikke overstige 15 minutter for et hvilket som helst sæt af Kontroller/prøver.
3. Inkubér i 60±10 minutter ved 18-25° C.
4. Dekantér stripindholdet ved hurtigt at vende op og ned på strips over en vask, hvori der kan bortskaffes biologiske materialer, idet prøvernes potentielle smittefare tages i betragtning. Aftryk de omvendte strips godt med papirservietter.
5. Vask brøndene **tre gange** med minimum 200µl fortyndet Vaskebuffer. **Dekantér og aftryk efter hvert vasketrin.**
6. Tilsæt 100µl IgG/IgM Konjugat til hver brønd.
7. Inkubér i 30±5 minutter ved 18-25° C.
8. Gentag trin 4 og 5.
9. Tilsæt 100 µl Substrat til hver brønd.
10. Inkubér i 30±5 minutter ved 18-25° C. **Der må ikke dekanteres.**
11. Tilsæt 100µl Stopopløsning til hver brønd i samme rækkefølge og hastighed som Substratet. Tap let på brøndene for at blande indholdet.
12. Aflæs strips indenfor 24 timer ved 550nm (540-565nm).



## BEREGNING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

### Betragt hver enkelt analyse separat ved beregning og fortolkning af resultater.

Beregn absorptionsværdi- (optisk densitet) forholdet for de Positive og Negative Kontroller og for hver enkelt prøve.

$$\text{Absorptionsforhold} = \frac{\text{Prøve eller Kontrolabsorptionsværdi}}{\text{middel-Referencekontrolabsorptionsværdi}}$$

Brugere skal beregne en cut-off værdi mellem positive og negative prøver, der er specifik for deres patientpopulationer. Resultater fra patientpopulationerne, der blev brugt i Euro Diagnosticas kliniske undersøgelse, foreslår den følgende cut-off:

<u>Absorptionsforhold</u>	<u>Resultatsfortolkning</u>
<0,7	Negativ
≥0,7 til < 1,0	Grænseværdi – omtestning anbefales på efterfølgende prøve
≥1,0	Positiv

## KVALITETSKONTROL

Sørg for, at fyldestgørende vedligehold og kalibrering af pladelæseren udføres i overensstemmelse med fabrikantens vejledning og at den korrekte bølglængde anvendes.

Brugere skal sikre sig, at de er helt bekendt med analysevejledningen og især afsnittene Advarsler og forholdsregler og Håndterings- og proceduremæssige bemærkninger. Brugere skal kunne vise, at de kan opnå ydelsesspecifikationer for præcision og rapportområder for testresultater, der svarer til de, der er blevet etableret af fabrikanten, før patienttestresultater rapporteres. Det anbefales, at de forforyndede Positive og Negative Kontroller køres i duplikat i alle analyser for at overvåge testprocedurens kvalitet. Kør klar til brug-Referencekontrollen i duplikat i alle analyser.

Hvis de præcisionsspecifikationer, som fabrikanten anfører, opfyldes, vil eventuel svigt af en Kontrol til at opfylde de Kontrolforholdsspecifikationer, der er anført nedenfor, ugyldiggøre analysen og patientresultaterne må så ikke rapporteres. Operatøren kan gentage analysen efter at have gennemgået proceduren eller kontakte distributøren/producenten. Hvis analysen gentages, skal der fremstilles en frisk opløsning af hver Kontrol og prøve. Laboratorier vil måske ønske at inkludere interne (egne) kontroller i hver analysekørsel. Sådant kontrolmateriale skal opbevares ved eller under -20° C og gentagne nedfrysningsoptøningscykluser skal undgås. Konserveringsmidler, som fx natriumazid ved 0,1% (w/v), vil ikke påvirke prøveresultater.

De analytiske niveauer, der er blevet identificeret ved bestemte sygdomme, er de, der er blevet etableret af producenten for specifikke populationer, og vil ikke nødvendigvis afspejle litteraturen. Incidensniveauer, deres forhold til specifikke sygdomme, referenceområder, og behørig cut-off punkter skal alle beregnes for de specifikke populationer, der serviceres af brugerne.

<b>Kontrolforholdsspecifikationer</b>	
$\frac{\text{Positiv kontrolabsorptionsværdi}}{\text{Referencekontrolabsorptionsværdi}}$	se Positiv Kontrol-mærkat
$\frac{\text{Negativ kontrolabsorptionsværdi}}{\text{Referencekontrolabsorptionsværdi}}$	<0,7

## FORVENTEDE VÆRDIER

169 serumprøver fra asymptomatiske, tilsyneladende raske donorer uden anamnese på autoimmun eller rheumatisk sygdom, blev analyseret for IgG og IgM autoantistoffer rettet mod nukleære antigener. Denne population blev sammensat på tværs af fire europæiske centre; resultaterne blev sammenlignet med konventionel immunofluorescens ved brug af HEp-2 celler som substrat. Ved brug af et cut-off forhold på 0,7 blev følgende overensstemmelse fundet.

		DIASTAT	
		+ve	-ve
IFA	+ve	1	1
	-ve	10	158

Samlet overensstemmelse = 94%

### *Sammenligning med Immunofluorescens*

363 serumprøver fra patienter med bindevævssygdom (CTD) blev sammenlignet med immunofluorescens på prøver fra patienter med bindevævssygdom på en række europæiske centre. Positivitet eller negativitet på IFA blev tildelt i henhold til undersøgelsescenterets kriterier.

		DIASTAT	
		+ve	-ve
IFA	+ve	204	32
	-ve	8	119

Sensitivitet = 86%

Specificitet = 94%

Samlet overensstemmelse = 89%

### *Sammenligning med Immunofluorescens-mønstre*

IFA-mønster	n	DIASTAT ANA Positiv	% overens- stemmelse
Centromer	35	34	97
Nukleolær/Plettet	26	25	96
Homogen	35	32	91
Plettet	61	53	87
Nukleolær	47	36	77

**Sammenligning med Immunfluorescens efter individuelle antistoffer**

Analysen blev sammenlignet med immunfluorescens, med individuelle autoantistof specificiteter. Disse blev bestemt ved brug af de specifikke DIASTAT® ELISA kits.

Antistof specificitet	DIASTAT Positiv (ANA)	Positiv (IFA)	% overensstemmelse
Ro (SS-A)	10	10	100
La (SS-B)	6	6	100
Sm	9	9	100
Sm/RNP	20	20	100
Scl-70	38	38	100
dsDNA	15	16	94
Centromer	61	62	98
Histon	12	13	92

28 prøver, der var identificeret som Jo-1 positive ved brug af DIASTAT® anti-Jo-1 ELISA, blev kørt i DIASTAT® ANA kittet med de følgende resultater:

24/28 (85,7%) var positive i ANA testen.

3/28 (10,7%) faldt indenfor grænseværdiområdet. Deres forhold var 0,99, 0,86 og 0,78.

1/28 (3,6%) gav et forhold på 0,67.

**YDELSESDATA****Unøjagtighed**

- Intra-analyse unøjagtighed** blev bestemt ved at teste tre kontroller i tre analyser, ved brug af tre operatører, med replikation på otte.

Kontrol	Absorbansværdi	SD	%CV
1	0,771	0,026	3,4
2	1,102	0,031	2,8
3	1,136	0,055	4,8

- Inter-analyse unøjagtighed** blev bestemt ved at teste seks kontroller i 20 analyser, ved brug af tre operatører og otte kit-batches, med replikation på fire.

Kontrol	Absorbansværdi	SD	%CV
1	0,219	0,031	14,2
2	0,273	0,031	11,4
3	0,365	0,036	9,9
4	0,521	0,036	6,9
5	1,078	0,130	12,1
6	1,012	0,131	12,9

---

## BRUGSBEGRÆNSNINGER

---

1. Skønt tilstedeværelsen af høje autoantistoftitre overfor nukleære antigener er indikativt for systemiske rheumatiske sygdomme, skal data overvejes i lyset af andre laboratorieresultater og kliniske fund.
2. Nogle personer kan have forhøjede niveauer af ANA'er med kun svag eller ingen evidens på klinisk sygdom. I modsætning hertil kan nogle patienter med evidens på klinisk sygdom have ikke-detekterbare niveauer af disse antistoffer.
3. Testen identificerer ikke ANA antistof specificiteten. Hvis en prøve giver et positivt resultat, skal yderligere tests udføres for at bestemme autoantistof specificiteten.
4. For gentagen patientprøvetagning, fx for monitorering, skal den samme prøvetype (serum eller EDTA plasma) bruges i hele undersøgelsesperioden.

---

## HENVISNINGER

---

1. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Disease and Probes for Cell Biology. *Advances in Immunology*, **44**, 93-151, 1982.
2. Nakamura RM, Tan EM. Recent Advances in Laboratory Tests and the Significance of Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases. *Clinics in Laboratory Medicine*, **6**, 41-53, 1986.
3. Sharp GC, Irvin WS, et al. Association of Autoantibodies to Different Nuclear Antigens with Clinical Patterns of Rheumatic Disease and Responsiveness to Therapy. *J Clin Invest*, **50**, 350-359, 1971.
4. Friou GJ. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Significance and Methods. *Arthritis Rheum*, **10**, 151-159, 1967.
5. Eds. Nakamura RM, Greenwald CA, et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Advances in Laboratory Tests and Significance in Systemic Rheumatic Diseases. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1978.

---

## PROTOKOLRESUMÉ

---

1. Fortynd prøver og Positive og Negative Kontroller 1:101. Referencekontrollen skal ikke fortyndes.
2. Tilsæt 100µl Referencekontrol i duplikat, forfortyndet Positive og Negative Kontroller og prøver i referencebrønde på mikrotiter strippen.
3. Inkubér i 60±10 minutter ved 18-25° C.
4. Vask strips 3 gange.
5. Tilsæt 100µl IgG/IgM Konjugat til hver brønd.
6. Inkubér i 30±5 minutter ved 18-25° C.
7. Vask strips 3 gange.
8. Tilsæt 100µl Substrat til hver brønd.
9. Inkubér i 30±5 minutter ved 18-25° C.
10. Tilsæt 100µl Stopopløsning til hver brønd.
11. Aflæs absorbans ved 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Código do lote / Lotnummer / Satsnummer
	Catalogue number / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Referência de catálogo / Bestillingsnummer / Katalognummer
	Use by / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Prazo de validade / Skal anvendes inden / Hållbar till
	Temperature limitation / Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura / Limites de temperatura / Opbevares ved / Temperaturgrænser
	Biological risks / Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung / /Rischio biologico / Risco biológico / Biologiske risici / Biologisk risk
	Consult instructions for use / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte as instruções de utilização / Læs brugsvejledning / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik / In vitro diagnostika
	Manufacturer / Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Fabricante Producent / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Contém o suficiente para "n" testes / Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Atenção / Advarsel / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro / Conformidade com In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC, Diretiva de Dispositivos Médicos / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

<b>CONJ</b>	Conjugate / Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Conjugado / Konjugat Konjugat
<b>SUBS</b>	Substrate / Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrato / Substrat / Substrat
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution / Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung / Soluzione bloccante / Solução de paragem / Stopopløsning / Stopplösning
<b>BUF WASH 16 x</b>	Wash buffer concentrate (16 X) / Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tampão de lavagem concentrado (16 X) / Vaskebufferkoncentrat (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
<b>Ag</b>	Hep-2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Hep-2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con HEp-2 / Hep-2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Hep-2 e supporto per strip / Poços revestidos com HEp-2 e suporte de tiras / Hep-2-coatede brønde og strip- holder / Hep-2-klädda brunnar och striphållare
<b>DIL SPE 5 X</b>	Sample Diluent 2 Concentrate (5 X) / Concentré 2 diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente 2 de Muestra (5 X) / Probediluens 2-Konzentrat / Diluente per campioni 2 concentrato (5 X) / Diluente de Amostras 2 concentrado (5 X) / Prøvediluent 2-koncentrat (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
<b>CONTROL REF</b>	ANA Reference Control / Témoin de référence ANA / Control de Referencia ANA / ANA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento ANA / Controllo de referência de ANAs / ANA Referencekontrol / ANA referenskontroll
<b>CONTROL +</b>	Positive Controls / Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Controlos Positivos / Positive kontrollen / Positiva kontrollen
<b>CONTROL -</b>	Negative Controls / Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Controlos Negativos / Negative kontrollen / Negativa kontrollen

## **SVENSKA : AVSEDD ANVÄNDNING**

---

DIASTAT<sup>®</sup> anti-nukleär antikroppstest (ANA) är en kvalitativt enzymänkad immunosorbentanalys (ELISA) för detektion av ANA i humant serum eller EDTA-plasma. Det detekterar ANA mot Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, ds-DNA, histone och centromerantigen.

Testet kan användas för att screena för prover som är negativa för alla ANA. Prov som ger ett positivt testresultat ska testas vidare för att identifiera den antigenspecifika antikroppen eller antikropparna som finns närvarande. Kvantitativa/kvalitativa ELISA-kit är tillgängliga för individuell detektion av Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), dsDNA och centromer ANA.

Kvalitativa kit är tillgängliga för den individuella detektionen av Scl-70 och Jo-1. ANA-detektion representerar en parameter i en diagnostisk process bestående av flera kriterier.

## **INLEDNING**

---

ELISA-metoderna erbjuder känslighet, reproducerbarhet, objektivitet över andra metoder och flexibilitet. DIASTAT<sup>®</sup>-testet detekterar total IgG- och IgM-antikroppar mot de extraherbara nukleära antigenen Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, dsDNA, histon och centromerantigen. Det detekterar också serumantikroppar som producerar homogena, centromer- och prickiga/nukleolära mönster i konventionell IFA-test.





DIASTAT<sup>®</sup> ELISA är en ändamålsenlig förstahandsscreen för total antikropp. Ett negativt resultat reducerar, men utesluter inte, sannolikheten av systemisk reumatisk sjukdom. Positiva resultat ska analyseras vidare för att identifiera de närvarande specifika antikropparna.

## **ANALYSPRINCIP**

---

Brunnarna i mikrotiterstripsen är beklädda med högrenat Hep-2 cellextrakt. Under den första inkubationen, binds specifika ANA i utspätt serum eller EDTA-plasma till den antigenbeklädda ytan. Brunnarna tvättas sedan för att avlägsna ej bundna komponenter. I den andra inkubationen binds konjugatet, enzymmärkta antikroppar mot humant IgG och IgM, till de ytbundna antikropparna. Efter ytterligare tvättning spåras specifika antikroppar genom inkubation med substrat. Tillsats av stopplösning avslutar reaktionen, som resulterar i en färgad slutprodukt. Mängden bundet konjugat mäts som absorbansenheter. Mängden bundet konjugat i närvaro av prov, jämförs med mängden bundet konjugat för referenskontrollen.

## KOMPONENTER I TESTKITET

<b>A</b>	IgG/IgM-konjugat	1 x 15 mL	Antikroppar mot humant IgG/IgM, som är konjugerade med alkaliskt fosfatas, tris-buffert, proteinstabilisator, <0,1% (m/v) natriumazid. <b>Klar att använda.</b>	
<b>B</b>	Substrat	1 x 15 mL	Mg <sup>2+</sup> , fenolftaleinmonofosfat (PMP), buffert. <b>Klar att använda.</b> Förvaras mörkt.	
<b>C</b>	Stopplösning	1 x 15 mL	Natriumhydroxid, EDTA, karbonatbuffert (pH >10). <b>Klar att använda.</b>	
<b>D</b>	Koncentrerad (16x) tvättbuffert	2 x 25 mL	Boratbuffert, 0,4% (m/v) natriumazid. <b>Spädes före användning.</b>	
<b>E</b>	Hep-2-belagda brunnar samt striphållare	12x8 mikrotiter-strips	Belagda med Hep-2-antigen, förpackade i återförslutbar folieförpackning tillsammans med torkmedel. Enskilda brunnar kan brytas loss från mikrotiterstripet.	
<b>F</b>	Koncentrerad spädvätska 2 (5x)	1 x 25 mL	Fosfatbuffert, proteinstabilisator, 5% (v/v) Triton X-100, 0,5% (m/v) natriumazid. <b>Spädes före användning.</b>	
<b>6</b>	ANA referenskontroll	1 x 1,5 mL	Human plasma, buffert, <0,1% (m/v) natriumazid. <b>Klar att använda.</b>	
<b>+/-</b>	Positiv kontroll negativ kontroll	1 x 0,2 mL 1 x 0,1 mL	Human plasma, <0,1% (m/v) natriumazid. <b>Spädes 1:101 med utspädd spädvätska 2 före användning, på samma sätt som patientproven.</b>	
	Bruksanvisning			

## FÖRVARING

### Hållbarhet efter öppnandet

Ett kit öppnades och återvändes vid tre tillfällen under en tremånadersperiod utan försämring av egenskaperna.

### Hantering och förfarande

1. Lagra komponenterna vid 2-8° C. Använd inte någon komponent efter det utgångsdatum som anges på etiketten.
2. Blanda inte komponenter med olika satsnummer.
3. Frys inte komponenterna.
4. Glöm inte att späda koncentrerad tvättbuffert, spädvätska 2 och positiva och negativa kontroller före användning. De övriga komponenterna är klara att använda.
5. Tvättbuffert och spädvätska för prov är stabila efter utspädning under upp till 6 månader, om de förvaras vid 2-8° C och inte kontamineras med mikroorganismer.
6. Lägg tillbaka oanvända mikrotiterstrips i folieförpackningen och förvara vid 2-8° C tillsammans med torkmedlet, tills produkten skall användas på nytt.
7. Platt hållaren är utformad för plattor med lossbrytbara brunnar.
8. Utsätt ej substratet för ljus under förvaring.
9. Undvik att kontaminera reagensen. Använd en ny engångspipett för varje pipettering av reagens respektive prov.

### Tecken på försämrade egenskaper

Substratet skall ha blekgul färg. Om färgen är skär har substratet kontaminerats och måste kasseras. Grumlighet eller fällning i någon komponent innebär att komponenten inte längre är i fullgott skick och måste kasseras.



**Provtagning och provförvaring**

Analysen är avsedd för serumprov/EDTA plasmaprov; använd inte prov som är lipemiska, hemolyserade eller grumliga. Blanda upptinade prov omsorgsfullt före analysen, och undvik upprepad frysning/tining. Värmeinaktivera inte proven, eftersom detta kan orsaka falskt positiva svar. Proven kan förvaras outspädda vid -20° C eller analyseras inom 12 timmar.

**VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSMÅTT****Avsett endast för *in vitro* diagnostik.****Försiktighetsmått**

1. Följ anvisningarna i den här texten noggrant, särskilt i fråga om hantering och lagring.
2. Standarder och kontroller innehåller human plasma som testats med FDA-godkända metoder för analys av hepatit B-antigen, HCV-, HIV-1- och HIV-2-antikroppar, och som därvid befunnits negativa. Eftersom det inte finns någon känd testmetod som garanterar att inga infektiösa agens förekommer bör standarder och kontroller behandlas som potentiellt infektiösa, och hanteras med samma försiktighet som annat potentiellt farligt material. I manualen från CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3e upplagan 1993, beskrivs hur sådana material bör hanteras enligt god laboratoriesed. Denna gäller i USA.
3. Pipettera inte med munnen.
4. I områden där kitet eller proven hanteras får ingen rökning, förtäring eller sminkning förekomma.
5. Alla hudskador som skärsår, skrubbsår osv skall skyddas på lämpligt sätt.
6. I standarderna, kontrollerna, konjugatlösningen, spädvätskan 2 och tvättbufferten ingår natriumazid, som kan reagera med bly och koppar och därvid ge upphov till explosiva metallazider. När vätskorna spolats ut skall de spädas med stora mängder vatten för att förhindra att azider ansamlas.
7. Stopplösningen innehåller natriumhydroxid. Undvik kontakt med hud, ögon och slemhinnor. Spill bör samlas upp med stora mängder vatten. Om vätskan kommer i kontakt med huden eller ögonen sköljs den exponerade ytan med vatten och kontakt tas med läkare omedelbart.
8. Substratet innehåller PMP, Bronidox L och dietanolamin. Undvik kontakt med hud, ögon och andningsorgan. Om kontakt med hud, ögon eller andningsorgan, skölj med vatten och sök medicinsk hjälp.
9. På begäran kan Euro Diagnostica tillhandahålla säkerhetsdatablad om alla farliga komponenter som ingår i kitet.

**Varning****B.**

SUBS

Innehåller: Dietanolamin

H319:	Orsakar allvarlig ögonirritation.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P305+P351+P338:	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P337+P313:	Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.

**Varning****C.**

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

Innehåller: Natriumhydroxid

H315:	Irriterar huden.
H319:	Orsakar allvarlig ögonirritation.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P302+P352:	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.
P305+P351+P338:	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P332+P313:	Vid hudirritation: Sök läkarhjälp.
P337+P313:	Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.

**Varning****D. and F.**

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Innehåller: Natriumazid

H302:	Skadligt vid förtäring.
EUH032:	Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.
H412:	Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P301+P312:	VID FÖRTÄRING: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare om du mår dåligt.
P273:	Undvik utsläpp till miljön.

## FÖRBEREDELSE

### ***Material/utrustning som behövs men som inte medföljer***

1. Avläsare med filter för 550 nm, för avläsning av plattor med 96 provbrunnar (avläsning vid 540-565 nm kan accepteras).
2. Precisionspipetter, engångs, 10 µL, 100 µL, 1 mL. Automatisk pipett för dosering av 100 µL. Automatisk pipett för dosering av 200 µL vid manuell tvättning; automatisk platttvättare kan användas.
3. Mätcylinder av glas/plast: 1×100 mL, 1×400 mL.
4. Behållare med volymen 1 mL.
5. Destillerat/avjoniserat vatten.
6. Pappershanddukar.
7. Timer för intervall om 30 och 60 minuter.

### Förberedelser för analysen

Låt alla komponenter i kitet, inklusive mikrotiterstripsen, anta en temperatur på 18-25° C, under 30-60 minuter före användning. Blanda reagensen genom försiktig vändning upp och ned.

#### Späd inte referenskontrollen.

Späd följande reagens och blanda omsorgsfullt.

Reagens	Volym	Tillsätt
Koncentrerad tvättbuffert	1 flaska	375 mL destillerat/avjoniserat vatten
Koncentrerad spädvätska 2	1 flaska	100 mL destillerat/avjoniserat vatten
Positiva och negativa kontroller/analysprov	10 µL	1 mL utspädd spädvätska 2

Brunnarna för mikrotitrering tillhandahålls i strips om åtta brunnar. Om något antal än en multipel med åtta skall användas gör man så här:

1. Lossa stripen från hållaren genom att trycka underifrån.
2. Bryt loss det antal brunnar som behövs.
3. Haka fast det rektangulära hålet vid nederkanten (rad H) på hållarens spår.
4. Se till att det kvadratiska hålet, med hacket till vänster, sitter ordentligt fast vid överkanten (rad A).

## ANALYSFÖRFARANDE

1. Gör ett schema över brunnarna för identifiering.
2. Pipettera 100 µL referenskontroll i duplikat, förutspädda positiva och negativa kontroller samt patientprov i respektive brunnar. Kom ihåg att byta pipettspets mellan pipetteringarna. Detta steg bör inte få ta mer än 15 minuter för varje uppsättning av standarder, kontroller och patientprov.
3. Inkubera under 60±10 minuter vid 18-25° C.
4. Dekanterar innehållet i brunnarna genom att snabbt vända plattan upp och ned över en avloppsvask som är godkänd för biologiska vätskor. Tänk på att proven kan vara infektiösa. Sug upp restfukt från de tömda plattorna med pappershandukar.
5. Tvätta brunnarna **tre gånger** med minst 200 µL utspädd tvättbuffert. **Häll av och sug upp restfukt efter varje tvättning.**
6. Tillsätt 100 µL IgG-/IgM-konjugat till varje brunn.
7. Inkubera under 30±5 minuter vid 18-25° C.
8. Upprepa stegen 4 och 5.
9. Tillsätt 100 µL substrat till varje brunn.
10. Inkubera under 30±5 minuter vid 18-25° C. **Häll inte av vätskan.**
11. Tillsätt 100 µL stopplösning till varje brunn, i samma ordning och med samma takt som tillsatsen av substrat. Knacka försiktigt på brunnarna för att blanda.
12. Avläs plattorna vid 550 nm (540-565 nm) inom 24 timmar.

## BERÄKNINGAR OCH BEDÖMNING AV RESULTATET

Vid beräkning och bedömning av resultatet skall varje analys behandlas separat.

Beräkna absorbanskvoten (optisk täthet) för de positiva och negativa kontrollerna och för patientproven.

$$\text{Absorbanskvoten} = \frac{\text{Absorbansvärdet för patientprov eller kontroll}}{\text{Medelvärde av absorbansvärdet för referenskontrollen}}$$

Användaren bör beräkna en gräns mellan positiva och negativa svar prov är specifik för den aktuella patientpopulationen. Resultatet från de patientpopulationer som medverkat vid Euro Diagnosticas kliniska studier indikerar följande gränser:

Absorbanskvot	Bedömning av resultatet
<0.7	Negativ
≥0.7 till <1.0	Gränsfall - analysen bör göras om
≥1.0	Positiv

## KVALITETSSÄKRING

Se till att plattavläsaren får föreskrivet underhåll och kalibreras enligt tillverkarens anvisningar.

Kontrollera att rätt våglängd används.

Användarna bör se till att de är helt införstådda med analysanvisningarna, särskilt avsnittet Varningar och försiktighetsmått, liksom med beskrivningen av hantering och förfarande. Användarna bör kunna visa att de kan uppnå värden i fråga om precision och rapporterbara intervall för analysresultaten som kan jämföras med tillverkarens uppgifter, innan resultat från analys av patientproven rapporteras. Det är lämpligt att dubbla förutspädda positiva och negativa kontrollprov vid alla analyser, för att därigenom kunna kontrollera testproceduren. Sätt den användningsklara referenskontrollen i två brunnar vid alla kvalitativa analyser.

Förutsatt att de precisionsvärden som tillverkaren uppger kan uppnås, måste varje analys förkastas där någon av kontrollerna faller utanför specifikationerna nedan. Sådana analysresultat skall inte rapporteras. Användaren kan upprepa analysen efter granskning av sina rutiner, eller kontakta leverantören/tillverkaren. Vid förnyad analys skall nya spädningar göras av respektive kontrollprov och patientprov. Laboratorierna kan vilja inkludera egna kontroller vid varje analys.

Sådana kontroller skall förvaras vid -20° C eller lägre och bör inte omfrysas när de tinats.

Konservierungsmedel som natriumazid i koncentrationen 0,1% (m/v) påverkar inte analysresultaten.

De nivåer av analyt som identifierats för olika sjukdomar är de som tillverkaren har fastställt för givna populationer, och behöver inte med säkerhet motsvara värden som anges i litteraturen. Prevalens, samband med specifika sjukdomar, referensintervall och lämpliga gränsvärden bör beräknas för den speciella patientpopulation som användaren betjänar.

### Specifikationer för kontrollernas absorbanskvot

Specifikationer	
Absorbans positiv kontroll	se etikett för positiv kontroll
Absorbans referenskontroll	
Absorbans negativ kontroll	<0.7
Absorbans referenskontroll	

## FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Vi rekommenderar att användare av ANA Microplate EIA kit fastställer en kvot för sin patientpopulation som ger optimal urskiljning mellan negativa och positiva prover.

### Referensområde

Totalt 169 serumprover från asymptomatiska, till synes friska frivilliga givare utan historia av autoimmun eller reumatisk sjukdom testades vid fyra olika kliniker med DIASTAT<sup>®</sup> ANA Microplate EIA kit för IgG och IgM-antikroppar. Resultaten jämfördes med en konventionell immuno-fluorescensmetod (IFA) med HEp-2-celler som substrat. Med en gränsvärdesproportion på 0,7 etablerades följande korrelation:

		DIASTAT	
		+ve	-ve
IFA	+ve	1	1
	-ve	10	158

Detta representerar en total korrelation på 94 %.

En jämförelse mellan DIASTAT<sup>®</sup> ANA Microplate EIA och immunofluorescens-metod på patienter med connective tissue disease (CTD) utfördes på totalt 363 serumprover vid ett antal Europeiska kliniker. Positivitet eller negativitet vid IFA fastställdes enligt experimentklinikens kriterier. Följande resultat erhöles:

		DIASTAT	
		+ ve	- ve
IFA	+ ve	204	32
	- ve	8	119

Sensitivitet = 86 %

Specificitet = 94 %

Total korrelation = 89 %

Fyra experimentkliniker utvärderade serum från patienter med olika autoimmuna sjukdomar som innehöll en mängd autoantikroppar och en mångfald av färgmönster på HEp-2 cellinjesubstrat. Jämförelse mellan DIASTAT<sup>®</sup> ANA Microplate EIA analys och följande immunofluorescensmönster utfördes.

IFA-mönster	n	DIASTAT ANA positiv	% Korrelation
Centromer	35	34	97
Nukleolärt/kornigt	26	25	96
Homogent	35	32	91
Kornigt	61	53	87
Nukleolärt	47	36	77

Jämförelse mellan DIASTAT® ANA Microplate EIA analys och immunfluorescensmetod med enskilda autoantikroppsspecificiteter. Enskilda autoantikroppsspecificiteter fastställdes med specifika EIA-testkit.

Antikropps-specificitet	Positiv vid DIASTAT ANA	IFA-positiv	% Korrelation
Ro (SS-A)	10	10	100
La (SS-B)	6	6	100
Sm	9	9	100
Sm/RNP	20	20	100
Sci/70	38	38	100
Centromer	61	62	98
DsDNA	15	16	94
Histon	12	13	92

28 prover som identifierats som Jo-1-positiva med DIASTAT® anti-Jo-1 ELISA analyserades med DIASTAT® ANA-kitet med följande resultat:

24/28 (85.7%) var positiva i ANA-testet.

3/28 (10.7%) föll igenom gränfallsområdet.

Deras kvot var 0.99, 0.86 och 0.78. 1/28 (3.6%) ger en kvot av 0.67.

## P R E S T A N D A

### Precision

- Precisionen inomserie** fastställdes genom test av tre olika kontroller i åtta replikat, i tre separata analyser, med tre operatörer och tre kitsatser. Samtliga analyser utfördes vid +20° C.

Kontroll	Absorbansvärde	SD	RMS % CV
1	0,771	0,026	3,4
2	1,102	0,031	2,8
3	1,136	0,055	4,8

- Precisionen mellanserie** fastställdes genom test av sex kontroller i fyra replikat vardera, i 20 separata analyser, med tre operatörer och åtta kitsatser. Samtliga analyser utfördes vid +20 °C.

Kontroll	Absorbansvärde	SD	% CV
1	0,219	0,031	14,2
2	0,273	0,031	11,4
3	0,365	0,036	9,9
4	0,521	0,036	6,9
5	1,078	0,130	12,1
6	1,012	0,131	12,9

---

## B E G R Ä N S N I N G A R

---

1. Även om förekomsten av hög titer av antinukleära antikroppar indikerar systemisk reumatisk sjukdom måste uppgifterna bedömas tillsammans med andra kliniska fynd och laboratorieresultat.
2. Vissa individer kan ha ökade nivåer av antinukleära antikroppar, med lite eller inga symptom på klinisk sjukdom. Å andra sidan kan vissa patienter med symptom på klinisk sjukdom ha odetekterbara nivåer av dessa antikroppar.
3. DIASTAT® ANA Microplate EIA test identifierar inte specificiteten hos antinukleära antikroppar. Ytterligare tester av positiva prover krävs för att definiera autoantikroppsspecificitet.
4. Om omtestning av patient eller om efterföljande prover krävs, rekommenderar vi att samma typ av prov (serum eller plasma) används.

---

## R E F E R E N S E R

---









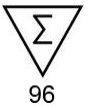


1. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Disease and Probes for Cell Biology. *Advances in Immunology*, **44**, 93-151, 1982.
2. Nakamura RM, Tan EM. Recent Advances in Laboratory Tests and the Significance of Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases. *Clinics in Laboratory Medicine*, **6**, 41-53, 1986.
3. Sharp GC, Irvin WS, et al. Association of Autoantibodies to Different Nuclear Antigens with Clinical Patterns of Rheumatic Disease and Responsiveness to Therapy. *J Clin Invest*, **50**, 350-359, 1971.
4. Friou GJ. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Significance and Methods. *Arthritis Rheum*, **10**, 151-159, 1967.
5. Eds. Nakamura RM, Greenwald CA, et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Advances in Laboratory Tests and Significance in Systemic Rheumatic Diseases. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1978.

---

## P R O C E D U R S A M M A N F A T T N I N G

---

1. Späd prov och positiv och negativ kontroll 1:101. Späd ej referenskontrollen.
2. Tillsätt 100 µL referenskontroll i duplikat samt utspädda prov, positiva och negativa kontroller i respektive mikrobrunnar.
3. Inkubera vid rumstemperatur (18-25° C) i 60±5 minuter.
4. Tvätta stripsen 3 gånger.
5. Tillsätt 100 µL IgG/IgM-konjugat i varje brunn.
6. Inkubera vid rumstemperatur (18-25° C) i 30±5 minuter.
7. Tvätta stripsen 3 gånger.
8. Tillsätt 100 µL substratlösning i varje brunn.
9. Inkubera strips vid rumstemperatur (18-25° C) i 30±5 minuter.
10. Tillsätt 100 µL stopplösning i varje brunn.
11. Avläs absorbans vid 550 nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Código do lote / Lotnummer / Satsnummer
	Catalogue number / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Referência de catálogo / Bestillingsnummer / Katalognummer
	Use by / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Prazo de validade / Skal anvendes inden / Hållbar till
	Temperature limitation / Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura / Limites de temperatura / Opbevaes ved / Temperaturgrænser
	Biological risks / Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung / /Rischio biologico / Risco biológico / Biologiske risici / Biologisk risk
	Consult instructions for use / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte as instruções de utilização / Læs brugsvejledning / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik / In vitro diagnostika
	Manufacturer / Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Fabricante Producent / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Contém o suficiente para "n" testes / Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Atenção / Advarsel / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro / Conformidade com In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC, Diretiva de Dispositivos Médicos / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.



<b>CONJ</b>	Conjugate / Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Conjugado / Konjugat Konjugat
<b>SUBS</b>	Substrate / Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrato / Substrat / Substrat
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution / Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung / Soluzione bloccante / Solução de paragem / Stopopløsning / Stopplösning
<b>BUF WASH 16 x</b>	Wash buffer concentrate (16 X) / Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tampão de lavagem concentrado (16 X) / Vaskebufferkoncentrat (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
<b>Ag</b>	Hep-2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Hep-2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con HEp-2 / Hep-2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Hep-2 e supporto per strip / Poços revestidos com HEp-2 e suporte de tiras / Hep-2-coatede brønde og strip- holder / Hep-2-klädda brunnar och striphållare
<b>DIL SPE 5 X</b>	Sample Diluent 2 Concentrate (5 X) / Concentré 2 diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente 2 de Muestra (5 X) / Probediluens 2-Konzentrat / Diluente per campioni 2 concentrato (5 X) / Diluente de Amostras 2 concentrado (5 X) / Prøvediluent 2-koncentrat (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
<b>CONTROL REF</b>	ANA Reference Control / Témoin de référence ANA / Control de Referencia ANA / ANA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento ANA / Controllo de referência de ANAs / ANA Referencekontrol / ANA referenskontroll
<b>CONTROL +</b>	Positive Controls / Témoins positifs / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Controlos Positivos / Positive kontrollen / Positiva kontrollen
<b>CONTROL -</b>	Negative Controls / Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Controlos Negativos / Negative kontrollen / Negativa kontrollen

**EURO DIAGNOSTICA AB**

Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden  
 Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88  
 E-mail: info@eurodiagnostica.com  
 www.eurodiagnostica.com