

EN



Anti-Histone Antibody (AHA) ELISA

IVD

CLIA Complexity: High
CDC Analyte Identification Code: 0437
CDC Test System Identification Code: 28354

PRODUCT INSERT

REF 1119 Histone (AHA) Antibody ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and semi-quantitation of anti-histone antibodies in human serum.

SUMMARY AND EXPLANATION

Antibodies to histone, a protein associated with DNA in the nucleus of the eukaryotic cells, occur in a number of clinical conditions but primarily in *systemic lupus erythematosus* (SLE), drug induced LE and in drug induced antinuclear antibody positive patients¹⁻⁸. There are several assays for the detection of anti-histone antibodies but indirect immunofluorescence and ELISA seem to be more specific and have been used more frequently¹⁻⁸. Indirect immunofluorescence methods, even though specific for anti-histone antibodies, can not be used with sera that contain anti-DNA antibodies⁵. In addition, anti-histone antibodies to H3 and H4 are not detected by the indirect immunofluorescence method. Because of the limitations of the latter assay, the ELISA method has been the method of choice for the detection of anti-histone antibodies.

Anti-histone antibodies occur in approximately 50% of unselected SLE sera and in 83% of active SLE patients⁶. Almost all patients with drug induced LE and 22% of patients with drug induced ANA are positive for anti-histone antibodies¹. In addition to idiopathic and drug induced LE, anti-histone antibodies also occur in approximately 10-15% of patients with rheumatoid arthritis and in patients with mixed connective tissue disease (MCTD) and scleroderma. The anti-histone antibody levels are much higher in idiopathic and drug induced LE as compared to rheumatoid arthritis, MCTD and scleroderma.

With the advent of the ELISA method, anti-histone antibodies have been found to be of both IgG and IgM isotypes. In idiopathic SLE both IgG and IgM anti-histone antibodies occur. A correlation between IgG anti-histone antibody levels and the severity of lupus has also been reported³⁻⁶. However, in drug induced LE the incidence of anti-histone antibodies of each class varies. For example, in procainamide and hydralazine induced LE, the anti-histone antibodies are predominantly of the IgM class⁴.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

The anti-histone antibody test is performed as a solid phase immunoassay (ELISA). Microwells are coated with various types of histone antigen followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Controls, calibrators and patient serum samples are incubated in the antigen coated wells which allows anti-histone antibodies present in the serum to bind. Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Antibodies bound to the microwells are detected by adding a polyvalent enzyme labeled anti-human conjugate to the wells. The enzyme conjugated antibodies bind specifically to the human immunoglobulin. Unbound enzyme conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies to histone is detected by a color change produced by the conversion of the pNPP substrate. The reaction is stopped and the intensity of color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. The results are expressed in ELISA units (EU/ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2°-8°C. **Do not freeze.**

Do not use, if reagents are not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature

(20°-25°C) prior to use. When stored at 2°-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell strips are for one time use only.

Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials⁹.

WARNING - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use beyond expiration date on the label.

Materials provided

ImmuLisa™ Histone (AHA) Antibody ELISA **REF** 1119









Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

| | | |
|------------|---|---|
| 12 x 8 | MICROPLATE AHA | Microplate with individual breakaway microwells coated with histone antigen. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR A AHA * | Ready to use Calibrator A (<i>green cap</i>). Human serum containing antibodies to histone. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR B AHA * | Ready to use Calibrator B (<i>violet cap</i>). Human serum containing antibodies to histone. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR C AHA * | Ready to use Calibrator C (<i>blue cap</i>). Human serum containing antibodies to histone. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR D AHA * | Ready to use Calibrator D (<i>yellow cap</i>). Human serum containing antibodies to histone. |
| 1 x 1.5 ml | CONTROL + AHA * | Ready to use Positive Control (<i>red cap</i>). Contains human serum positive for histone. |
| 1 x 1.5 ml | CONTROL - * | Ready to use Negative Control (<i>whitecap</i>). Contains human serum. |
| 1 x 12 ml | IgG/IgM-CONJ ALKPHOS * | Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink. |
| 1 x 60 ml | DIL * | Ready to use Serum Diluent . Color coded blue. |
| 1 x 12 ml | SUBSTRATE * | Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light. |
| 1 x 12 ml | STOP | Ready to use Stop Solution . |
| 2 x | BUF WASH | Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each. |

* Contains <0.1% NaN₃

EN

Symbols used on labels:

-  Lot number
-  Catalog number
-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions for use
-  In vitro diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 630 nm.
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

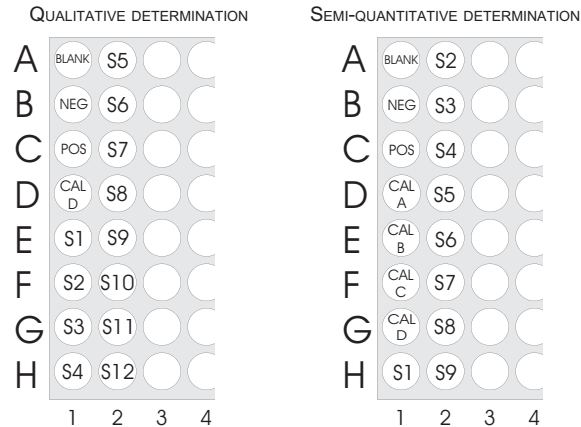
PROCEDURE

Procedural Notes

- Before starting with the assay read carefully the product insert.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate at room temperature before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Good washing technique is critical. If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.

Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate at room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a **qualitative determination** use only the Ready to Use Low Calibrator D (*vial with yellow cap*).
or For a **semi-quantitative determination** use the Ready to Use Calibrators A through D as depicted in the sample layout below.



- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **0.5 ml** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator.
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples to the appropriate microwells as per protocol sheet.
Note: Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within 1 hour from adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or 405/630nm dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be less than 20 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining the concentration of histone antibodies. While performing Qualitative determinations, the optical density of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations, the positive control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{EU/ml of Calibrator D} = \text{EU/ml Test Sample}$$

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.

Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such serum sample should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

Interpretation

The cutoff values were obtained by testing sera on 100 normal blood donors for AHA. The cutoff levels were established by determining the mean EU/ml. Values less than 2 SD of this normal were considered negative and values between 2-3 SD as equivocal. The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values. These may vary with the population examined.

| AHA value | Interpretation |
|-------------|----------------------------|
| < 20 EU/ml | Negative |
| 20-25 EU/ml | Indeterminate (Borderline) |
| >25 EU/ml | Positive |

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The ImmuLisa™ AHA Test should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only. The results obtained serve only as an aid in the diagnosis and should not be interpreted as diagnostic in themselves.

EXPECTED VALUES

The incidence of AHA in various disease conditions appears below:

Incidence of Anti-Histone Antibodies

| Disease | Incidence % |
|---------------------------------|--------------------|
| Systemic lupus erythematosus | 42 |
| Drug induced LE | 100 |
| Drug induced ANA | 22 |
| Rheumatoid arthritis | 15 |
| Scleroderma | 10 |
| Mixed connective tissue disease | 15 |
| Sjögren's syndrome | 28 |
| Normal patients | 0 |

PERFORMANCE CHARACTERISTICS**Precision:**

The intra-assay and inter-assay coefficient of variation of the AHA test system was determined by taking positive samples of varying AHA levels and were found to be between 5-10%.

| AHA EU/ml | % C.V. |
|------------------|---------------|
| intra-assay | |
| 66.0 | 6.9 |
| 93.0 | 9.5 |
| 72.0 | 7.2 |
| inter-assay | |
| 83.8 | 9.3 |
| 73.3 | 5.2 |

The Immulisa™ AHA test kit was compared with another commercially available anti-histone ELISA test kit. A total of 129 sera identified as positive or negative for histone antibody immunofluorescence by a clinical reference laboratory were obtained and tested simultaneously with both kits. The clinical conditions of the patients was not known. All sera were tested according to the performance and quality control procedures recommended by the manufacturer. The relative specificity, relative sensitivity and agreement are shown in the following Table:

Comparison between AHA ELISA Methods

| | | ImmuliTM AHA | | |
|--------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|--------------|
| | | Positive | Negative | Total |
| Other ELISA | Positive | 36 | 4 | 40 |
| | Negative | 14 | 75 | 89 |
| | Total | 50 | 79 | 129 |

Agreement: 86%

Sensitivity: 90%

Specificity: 84%



Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά της ιστόνης (AHA)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1119 Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά της ιστόνης (AHA) 96 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων κατά της ιστόνης σε ορό ανθρώπου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα αντισώματα κατά της ιστόνης, μιας πρωτεΐνης που σχετίζεται με το DNA στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων, εμφανίζονται σε ποικίλες κλινικές καταστάσεις, αλλά κυρίως στο *συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο* (ΣΕΛ), στον επαγόμενο από φάρμακα ΕΛ, καθώς και σε ασθενείς με επαγόμενη από φάρμακα θετικότητα για αντιπυρηνικά αντισώματα¹⁻⁸. Διάφορες αναλύσεις χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των αντισωμάτων κατά της ιστόνης, μεταξύ των οποίων ο έμμεσος ανοσοφθορισμός και η ανάλυση ELISA φαίνεται πως είναι οι πιο ειδικές και έχουν χρησιμοποιηθεί συχνότερα¹⁻⁸. Οι μέθοδοι έμμεσου ανοσοφθορισμού, μολονότι είναι ειδικές για τα αντισώματα κατά της ιστόνης, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ορούς που περιέχουν αντισώματα κατά του DNA⁵. Επιπλέον, τα αντισώματα κατά των ιστονών H3 και H4 δεν ανιχνεύονται με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Λόγω των περιορισμών της μεθόδου αυτής, έχει επιλεγεί ως μέθοδος ανίχνευσης των αντισωμάτων κατά της ιστόνης η ανάλυση ELISA.

Αντισώματα κατά της ιστόνης εμφανίζονται περίπου στο 50% των μη επιλεγμένων ορών ΣΕΛ και στο 83% των ασθενών με ενεργό ΣΕΛ⁶. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς που πάσχουν από επαγόμενο από φάρμακα ΕΛ, καθώς και το 22% των ασθενών με επαγόμενη από φάρμακα θετικότητα σε αντιπυρηνικά αντισώματα, εμφανίζονται θετικοί στα αντισώματα κατά της ιστόνης¹. Εκτός από τους ασθενείς με ιδιοπαθή και με επαγόμενο από φάρμακα ΕΛ, τα αντισώματα κατά της ιστόνης εμφανίζονται επίσης στο 10-15% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, καθώς και στους ασθενείς με μικτή νόσο συνδετικού ιστού (ΜΝΣΙ) και με σκληροδερμία. Τα επίπεδα των αντισωμάτων κατά της ιστόνης είναι πολύ υψηλότερα στους ασθενείς με ιδιοπαθή και επαγόμενο από φάρμακα ΕΛ, από ότι στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, ΜΝΣΙ και σκληροδερμία.

Με την ανάπτυξη της μεθόδου ELISA, τα αντισώματα κατά της ιστόνης βρέθηκε ότι ανήκουν στους ισότυπους IgG και IgM. Στον ιδιοπαθή ΣΕΛ, εμφανίζονται τόσο IgG όσο και IgM αντισώματα κατά της ιστόνης. Έχει επίσης αναφερθεί συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα των IgG αντισωμάτων κατά της ιστόνης και στη σοβαρότητα του λύκου³⁻⁶. Ωστόσο, στον επαγόμενο από φάρμακα ΕΛ, η συχνότητα εμφάνισης αντισωμάτων διαφόρων τάξεων κατά της ιστόνης ποικίλλει. Για παράδειγμα, σε ασθενείς με επαγόμενο από προκαϊναμίδη και υδραλαζίνη ΕΛ, τα περισσότερα αντισώματα κατά της ιστόνης είναι της τάξης IgM⁴.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση αντισωμάτων κατά της ιστόνης διενεργείται ως μια ανοσολογική μέθοδος στερεάς φάσης (ELISA). Οι μικροκυψελίδες επικαλύπτονται με διάφορους τύπους του αντιγόνου της ιστόνης και, στη συνέχεια, τα σημεία που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των αντισωμάτων κατά της ιστόνης που υπάρχουν στον ορό. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν στις μικροκυψελίδες ανιχνεύονται με την προσθήκη ενός σημασμένου με πολυδύναμο ένζυμο συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης. Τα συζευγμένα με ένζυμο αντισώματα δεσμεύονται ειδικά στην ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα με το ένζυμο απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα ενζύμου (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων κατά της ιστόνης με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος pNPP. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται με φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA (EU/ml).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.**

Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

Προφυλάξεις

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών⁹.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μικροβιακής ή διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό τους. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά της ιστόνης (AHA) ImmuLisa™ **REF** 1119

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

| | | |
|------------|---|--|
| 12 x 8 | MICROPLATE AHA | Πλακίδιο ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με αντιγόνο ιστόνης. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR A AHA * | Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής A (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της ιστόνης. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR B AHA * | Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής B (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της ιστόνης. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR C AHA * | Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής C (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της ιστόνης. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR D AHA * | Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής D (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της ιστόνης. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL + AHA * | Έτοιμο προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για ιστόνη. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL - * | Έτοιμο προς χρήση διάλυμα αρνητικού ελέγχου (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου. |

EL

| | | |
|-----------|--------------------------------------|--|
| 1 x 12 ml | IgG/IgM-CONJ ALKPHOS * | Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ. |
| 1 x 60 ml | DIL * | Έτοιμο προς χρήση αραιωτικό διάλυμα ορού . Χρώματος μπλε. |
| 1 x 12 ml | SUBSTRATE * | Έτοιμο προς χρήση ενζυμικό υπόστρωμα . Περιέχει p-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). Να προστατεύεται από το φως . |
| 1 x 12 ml | STOP | Έτοιμο προς χρήση διάλυμα τερματισμού . |
| 2 x | BUF WASH | Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα. |

* Περιέχει < 0,1% NaN₃


Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT Αριθμός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου

 Ημερομηνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

IVD In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα
- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικά χαρτιά
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 630 nm.
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2 - 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για πιο μακροχρόνια φύλαξη, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις της διαδικασίας

- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος.
- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια της ανάλυσης να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Επιστρέψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών πρέπει να προετοιμαστούν προτού ξεκινήσει η ανάλυση.
- Είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής έκπλυσης. Εάν η έκπλυση δεν εκτελείται αυτόματα, επαρκής έκπλυση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας μια ισχυρή ριπή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από μια φιάλη έκπλυσης με ευρύ ακροφύσιο κατά μήκος ολόκληρου του πλακιδίου. **Συνιστάται η χρήση αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό, επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Σε όλα τα βήματα είναι σημαντικός ο προσεκτικός έλεγχος των χρόνων. Όλες οι περίοδοι επώασης ξεκινούν με την ολοκλήρωση της προσθήκης του αντιδραστηρίου.
- Η προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με τον ίδιο ρυθμό και με την ίδια σειρά.
- Αφαιρέστε από τη θήκη τις απαιτούμενες ταινίες μικροκυψελίδων και επανασφραγίστε προσεκτικά τη θήκη ώστε να αποτραπεί τυχόν συμπίκνωση υδρατμών στις αχρησιμοποίητες μικροκυψελίδες. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.

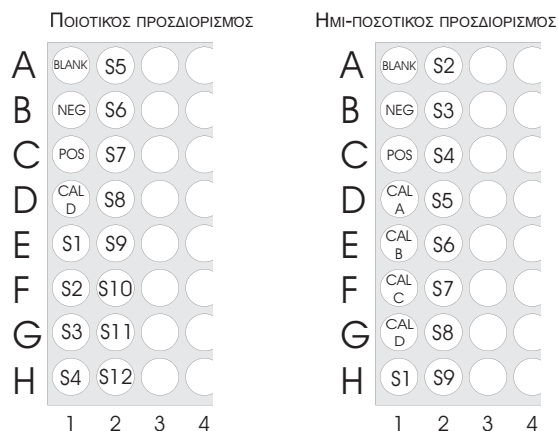
Μέθοδος ανάλυσης

Βήμα 1 Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Βήμα 2 Σημάνετε το φύλλο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στις μικροκυψελίδες. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.

Βήμα 3 Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο τον έτοιμο προς χρήση Βαθμονομητή D (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα)

ή Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τους έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές Α έως D, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διαμόρφωση δειγμάτων.



Βήμα 4 Προετοιμάστε μια αραιώση των δειγμάτων ασθενών σε αναλογία **1:101**, αναμιγνύοντας **5 μl** του δείγματος του ασθενούς με **0,5 ml** του αραιωτικού διαλύματος ορού.

Βήμα 5 Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκυψελίδες από τη θήκη και επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες που υπάρχουν στη σφραγισμένη θήκη στο ψυγείο.

EL

- Βήμα 6** Προσθέστε **100 μl** έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενών στις κατάλληλες μικροκυψελίδες, όπως υποδεικνύεται στο φύλλο πρωτοκόλλου.
Σημείωση: Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου.
- Βήμα 7** Επώαστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 8** Εκπλύνετε **4x** με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Για μη αυτόματη έκπλυση, πληρώστε κάθε μικροκυψελίδα με ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας το πλακίδιο και κτυπώντας το ελαφρά ώστε να αδειάσουν όλες οι κυψελίδες ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κυψελίδα. Για να στυπώσετε στο τέλος της τελευταίας έκπλυσης, αναστρέψτε τις ταινίες και κτυπήστε δυνατά τις κυψελίδες επάνω σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές έκπλυσης, προγραμματίστε τη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 10** Επώαστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 11** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 8.
- Βήμα 12** Προσθέστε **100 μl** ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 13** Επώαστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 14** Προσθέστε **100 μl** διαλύματος τερματισμού σε κάθε μικροκυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το ενζυμικό υπόστρωμα. Διαβάστε τις τιμές απορρόφησης εντός 1 ώρας από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 15** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **405 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος 405/630 nm, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι $<0,3$. Ο Βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή μικρότερη από 20 EU/ml. Εάν η ανάλυση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων κατά της ιστόνης. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φυλλάδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων του ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος

----- X EU/ml του βαθμονομητή D = EU/ml εξεταζ. δείγματος

Απ/ση του Βαθμονομητή D

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών A έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε EU/

EL

ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησής τους.

Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή Α. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν με το συντελεστή αραιώσης.

Ερμηνεία

Οι τιμές «cutoff» προέκυψαν από τον έλεγχο ορών από 100 φυσιολογικούς αιμοδότες για την παρουσία ΑΗΑ. Τα επίπεδα «cutoff» καθορίστηκαν από τον προσδιορισμό της μέσης τιμής συγκέντρωσης σε EU/ml. Τιμές μικρότερες από 2 τυπικές αποκλίσεις αυτού του φυσιολογικού εύρους θεωρήθηκαν αρνητικές και τιμές μεταξύ 2-3 τυπικών αποκλίσεων θεωρήθηκαν ισοδύναμες. Τα παρακάτω παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές. Οι τιμές αυτές ενδέχεται να ποικίλλουν σε κάθε πληθυσμό που εξετάζεται.

| Τιμή ΑΗΑ | Ερμηνεία |
|-----------------|------------------------|
| <20 EU/ml | Αρνητικό |
| 20-25 EU/ml | Απροσδιόριστο (οριακό) |
| >25 EU/ml | Θετικό |

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση αντισωμάτων ΑΗΑ ImmuLisa™ δεν θα πρέπει να εκτελείται σε δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, σε μολυσμένα από μικρόβια ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για την εξέταση δειγμάτων ορού ανθρώπου. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται υποβοηθούν μόνο τη διάγνωση και δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται από μόνα τους ως διαγνωστικά.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Παρακάτω εμφανίζεται η συχνότητα εμφάνισης των ΑΗΑ σε διάφορες νόσους:

| Συχνότητα εμφάνισης αντισωμάτων κατά της ιστόνης | |
|---|------------------------------|
| Νόσος | % συχνότητα εμφάνισης |
| Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος | 42 |
| Επαγόμενος από φάρμακα ΕΛ | 100 |
| Επαγόμενη από φάρμακα θετικότητα σε αντιπυρηνικά αντισώματα | 22 |
| Ρευματοειδής αρθρίτιδα | 15 |
| Σκληροδερμία | 10 |
| Μικτή νόσος συνδετικού ιστού | 15 |
| Σύνδρομο Sjögren | 28 |
| Φυσιολογικοί ασθενείς | 0 |

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Ακρίβεια:

Οι συντελεστές ποικιλοτήτας εντός σειράς και μεταξύ σειρών του συστήματος ανάλυσης αντισωμάτων ΑΗΑ προσδιορίστηκαν με τη λήψη θετικών δειγμάτων με διάφορα επίπεδα αντισωμάτων ΑΗΑ, και οι συντελεστές αυτοί βρέθηκαν να είναι μεταξύ 5 και 10%.

| AHA EU/ml | % Συντ. ποικιλ. |
|------------------|------------------------|
| εντός σειράς | |
| 66,0 | 6,9 |
| 93,0 | 9,5 |
| 72,0 | 7,2 |
| μεταξύ σειρών | |
| 83,8 | 9,3 |
| 73,3 | 5,2 |

Το κιτ ανάλυσης αντισωμάτων AHA ImmuLisa™ συγκρίθηκε με ένα άλλο διαθέσιμο στο εμπόριο κιτ ανάλυσης αντισωμάτων ELISA κατά της ιστόνης. Ένα σύνολο 129 ορών που ταυτοποιήθηκαν ως θετικοί ή αρνητικοί για ανοσοφθορισμό αντισωμάτων κατά της ιστόνης ελήφθησαν από ένα κλινικό εργαστήριο αναφοράς και ελέγχθηκαν ταυτόχρονα με τα δύο κιτ. Η κλινική κατάσταση των ασθενών δεν ήταν γνωστή. Όλοι οι οροί ελέγχθηκαν σύμφωνα με τις διαδικασίες απόδοσης και ελέγχου ποιότητας που συνιστά ο παρασκευαστής. Η σχετική ειδικότητα, η σχετική ευαισθησία και η συμφωνία προβάλλονται στον παρακάτω πίνακα:

Σύγκριση μεταξύ μεθόδων ELISA για αντισώματα AHA

| | | ImmuLisa™ AHA | | |
|---------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|---------------|
| | | Θετικά | Αρνητικά | Σύνολο |
| Άλλη μέθοδος ELISA | Θετικά | 36 | 4 | 40 |
| | Αρνητικά | 14 | 75 | 89 |
| | Σύνολο | 50 | 79 | 129 |

Συμφωνία: 86%
 Ευαισθησία: 90%
 Ειδικότητα: 84%

ES



Ensayo ELISA para anticuerpos antihistona (AHA)

IVD

PROSPECTO

REF 1119 ELISA para anticuerpos antihistona (AHA) 96 análisis

USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección y semicuantificación de anticuerpos antihistona en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos antihistona, una proteína unida al ADN en el núcleo de las células eucariotas, están presentes en un cierto número de condiciones clínicas, principalmente en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), LE inducido por fármacos y pacientes positivos a anticuerpos antinucleares por fármacos¹⁻⁸. Hay varios métodos de detección de anticuerpos antihistona, aunque los más específicos y usados con más frecuencia son la inmunofluorescencia indirecta y el método ELISA¹⁻⁸. Los métodos de inmunofluorescencia indirecta, aunque sean específicos para anticuerpos antihistona, no pueden aplicarse a sueros que contengan anticuerpos anti ADN⁵. Además, la inmunofluorescencia indirecta no detecta los anticuerpos antihistona H3 y antihistona H4. Dadas las mencionadas limitaciones, el método ELISA es el preferido para detectar anticuerpos antihistona.

Aproximadamente el 50% de los sueros no seleccionados de pacientes con LES y el 83% de pacientes con LES activo presentan anticuerpos antihistona⁶. Prácticamente todos los pacientes con LE inducido por fármacos y el 22% de pacientes con ANA inducido por fármacos son positivos a los anticuerpos antihistona¹. Además de LE idiopático e inducido por fármacos, los anticuerpos antihistona están presentes también en alrededor del 10-15% de pacientes con artritis reumatoide, enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD) y esclerodermia. Los niveles de anticuerpos antihistona son mucho más altos en LE idiopático e inducido por fármacos que en artritis reumatoide, MCTD y esclerodermia.

Con la aparición del método ELISA, se descubrió que los anticuerpos antihistona son de isotipos IgG e IgA. En el LES idiopático, están presentes ambos isotipos de anticuerpos. Se ha informado de una correlación entre los niveles de anticuerpos antihistona de clase IgG y la gravedad del lupus³⁻⁶. Sin embargo, en el LE inducido por fármacos la incidencia de los anticuerpos antihistona de cada clase varía; por ejemplo, en el LE inducido por procainamida e hidralazina predomina la clase IgM de anticuerpos antihistona⁴.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Inmunoensayo en fase sólida (ELISA) para detectar anticuerpos antihistona. Los micropocillos se recubren con diferentes tipos de antígeno histona; a continuación se bloquean los puntos que no han reaccionado para reducir las uniones no específicas. En los pocillos recubiertos de antígeno se incuban los controles, calibradores y muestras de suero del paciente, permitiendo que se unan los anticuerpos antihistona presentes en el suero. Los anticuerpos que no se han unido y demás proteínas séricas se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se detectan añadiendo a los pocillos un conjugado antihumano polivalente marcado con enzima. Los anticuerpos conjugados con enzima se unen específicamente a la inmunoglobulina humana. El conjugado enzimático no unido se elimina mediante lavado. A continuación, se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP); la presencia de anticuerpos antihistona es revelada por el cambio de color provocado por la conversión del sustrato pNPP. Se detiene la reacción y se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración del anticuerpo, con un espectrofotómetro a 405 nm. Los resultados se expresan en unidades ELISA (EU/ml).

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conservar los reactivos a 2-8°C. **No los congele.** No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C). Conservado a 2-8°C,

el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tampón de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

Precauciones

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales⁹.

ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN₃) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto. No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc.

Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

Material suministrado

ELISA para anticuerpos antihistona (AHA) ImmuLisa™ **REF** 1119

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis.

| | | |
|------------|---|---|
| 12 x 8 | MICROPLATE AHA | Microplaca con micropocillos individuales separables revestidos con antígeno histona. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR A AHA * | Calibrador A listo para usar (<i>tapa verde</i>). Suero humano con anticuerpos antihistona. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR B AHA * | Calibrador B listo para usar (<i>tapa morada</i>). Suero humano con anticuerpos antihistona. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR C AHA * | Calibrador C listo para usar (<i>tapa azul</i>). Suero humano con anticuerpos antihistona. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR D AHA * | Calibrador D listo para usar (<i>tapa amarilla</i>). Suero humano con anticuerpos antihistona. |
| 1 x 1.5 ml | CONTROL + AHA * | Control positivo listo para usar (tapa roja). Contiene suero humano positivo a histona. |
| 1 x 1.5 ml | CONTROL - * | Control negativo listo para usar (<i>tapa blanca</i>). Contiene suero humano. |
| 1 x 12 ml | IgG/IgM-CONJ ALKPHOS * | Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado. |
| 1 x 60 ml | DIL * | Diluyente de suero listo para usar. Color azul. |
| 1 x 12 ml | SUBSTRATE * | Substrato enzimático listo para usar. Contiene pNPP. Protéjase de la luz. |

ES

1 x 12 ml **STOP**

Solución Stop lista para usar.

2 x **BUF WASH**

Tampón de lavado en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro.


* Contiene <0.1% NaN_3

Símbolos utilizados en las etiquetas:

LOT Número de lote

REF Número de catálogo

 Fecha de caducidad

 Temperatura de conservación

 Léanse las instrucciones de uso

IVD Para diagnóstico *in vitro*

 Fabricante

 Número de análisis

Materiales necesarios no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido
- Pipetas con capacidad de 5 μl a 1000 μl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.
- Lavador automático de microplacas con capacidad de 200 μl

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO

Advertencias preliminares

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente. Vuelva a poner los materiales en la nevera inmediatamente después de su uso.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- Una buena técnica de lavado es crucial. Si efectúa el lavado manualmente, rocíe toda la microplaca con

un fuerte chorro de solución de lavado utilizando una botella de boca ancha. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**

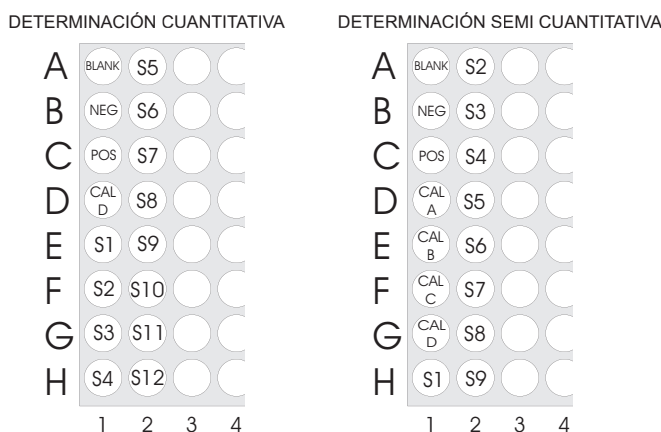
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.
- Las muestras y reactivos deben añadirse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
- Saque las tiras de pocillos de su sobre y ciérrelo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.

Procedimiento del ensayo

Paso 1 Los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de dar comienzo al ensayo.

Paso 2 Señale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.

Paso 3 **Determinación cualitativa:** use únicamente el Low Calibrator D (*frasco de tapa amarilla*) listo para usar. **Determinación semicuantitativa:** use los calibradores listos para usar de A a D como se muestra en el ejemplo siguiente:



Paso 4 Prepare una dilución de **1:101** de la muestra del paciente, mezclando **5 µl** de la muestra del paciente con **0.5 ml** de diluyente de suero.

Paso 5 Utilice los pocillos necesarios del sobre; guarde las tiras no utilizadas en el sobre hermético y póngalo en la nevera.

Paso 6 Pipetee **100 µl** de calibrador listo para usar, de controles positivo y negativo y muestras diluidas del paciente en los correspondientes pocillos, como se indica en la hoja de protocolo.

Nota: Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo.

Paso 7 Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 8 Lave **4 veces** con el tampón de lavado. Para lavado manual, llene cada pocillo con el tampón de lavado reconstituido. Elimine el líquido invirtiendo y sacudiendo el pocillo, o bien aspire el líquido de cada pocillo. Al terminar el último lavado, invierta las tiras y sacúdalas enérgicamente sobre papel absorbente. Si utiliza un lavador automático, programe el ciclo de lavado siguiendo las instrucciones del fabricante.

Paso 9 Pipetee **100 µl** de conjugado en los pocillos.

Paso 10 Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 11 Lave los pocillos repitiendo el paso 8.

ES

- Paso 12** Pipetee **100 µl** de substrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.
- Paso 13** Incube **30 minutos** (\pm 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Pipetee **100 µl** de solución Stop en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el substrato enzimático. Lea la absorbancia en el plazo de una hora después de haber añadido la solución Stop.
- Paso 15** Lea la absorbancia de cada pocillo a **405 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 405/630nm, comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser $<0,3$. La lectura de absorbancia del calibrador A no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <20 EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de las dos lecturas para determinar las EU/ml. Cuando se efectúan determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

RESULTADOS

Cálculo

Las concentraciones en la muestra del paciente se pueden determinar mediante dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. de muestra analizada

_____ X EU/ml de Calibrador D= EU/ml muestra analizada

Abs. de Calibrador D

2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los Calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en EU/ml en el eje X en relación a la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.

Calibrador

Los calibradores proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del Calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

Interpretación

Los valores límite se establecieron sometiendo a análisis para detección de AHA el suero de 100 donantes de sangre sanos. Los niveles límite se determinaron tomando la media de EU/ml. Valores con menos de 2 DS de esta norma se consideraron negativos; los valores entre 2 y 3 DS como dudosos. Las indicaciones que siguen son solamente una guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales, que podrán variar según la población examinada.

| Valor AHA | Interpretación |
|--------------|-----------------------|
| < 20 EU/ml | Negativo |
| 20-25 EU/ml | Incierto (Borderline) |
| >25 EU/ml | Positivo |

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El análisis para AHA ImmuLisa™ no debe efectuarse en muestras muy hemolizadas, contaminadas por microbios o lipémicas. Este método debe utilizarse únicamente para analizar muestras de suero humano. Los resultados obtenidos son sólo una ayuda para el diagnóstico y no deben interpretarse como un diagnóstico por sí solos.

VALORES ESPERADOS

La incidencia de AHA en diferentes condiciones patológicas se resume a continuación.

Incidencia de anticuerpos antihistona

| Enfermedad | Incidencia % |
|---------------------------------------|--------------|
| Lupus eritematoso sistémico | 42 |
| LE inducido por fármacos | 100 |
| ANA inducido por fármacos | 22 |
| Artritis reumatoide | 15 |
| Esclerodermia | 10 |
| Enfermedad mixta del tejido conectivo | 15 |
| Síndrome de Sjögren | 28 |
| Pacientes normales | 0 |

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Precisión:

El coeficiente de variación intraensayo y entre ensayo de AHA se determinó tomando muestras positivas con diferentes niveles de AHA; se estableció que está entre 5 y 10%.

| EU/ml AHA | % C.V. |
|--------------|--------|
| intra-ensayo | |
| 66,0 | 6,9 |
| 93,0 | 9,5 |
| 72,0 | 7,2 |
| entre ensayo | |
| 83,8 | 9,3 |
| 73,3 | 5,2 |

El ensayo para detección de AHA ImmuLisa™ se comparó con otro ensayo ELISA disponible en comercio para la detección de los mismos anticuerpos. Se analizaron 129 sueros procedentes de un laboratorio clínico de referencia y mediante inmunofluorescencia se los catalogó como positivos o negativos a anticuerpos antihistona; luego, fueron analizados simultáneamente con ambos kits. Se desconocían las condiciones clínicas de los pacientes. Los sueros se analizaron conforme con el procedimiento y controles de calidad indicados por el fabricante. La especificidad, sensibilidad y correspondencia relativas se indican en la siguiente tabla:

| | | Comparación entre métodos ELISA para AHA | | | |
|---------------|----------|--|----------|-------|----|
| | | AHA ImmuLisa™ | | Total | |
| Otro ELISA | Positivo | Positivo | Negativo | | 40 |
| | Negativo | 14 | 75 | 89 | |
| | Total | 50 | 79 | 129 | |

Correspondencia: 86%
Sensibilidad: 90%
Especificidad: 84%



Anti-Histon-Antikörper-ELISA (AHA)

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1119 Histon-Antikörper-ELISA (AHA) 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von Anti-Histon-Antikörpern in Humanserum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Antikörper gegen Histon, ein Protein, das mit der DNA im Nukleus von eukaryotischen Zellen in Verbindung steht, treten bei einer Reihe von klinischen Erscheinungen auf, hauptsächlich jedoch bei *systemischem Lupus erythematoses* (SLE), arzneimittelinduziertem LE und bei Patienten mit arzneimittelinduzierten positiven Testergebnissen für antinukleäre Antikörper¹⁻⁸. Es gibt mehrere Testmethoden für Anti-Histon-Antikörper, aber indirekte Immunfluoreszenz und ELISA scheinen spezifischer zu sein und werden am häufigsten angewendet¹⁻⁸. Obwohl indirekte Immunfluoreszenzmethoden für Anti-Histon-Antikörper spezifisch sind, können sie nicht mit Seren angewendet werden, die Anti-DNA-Antikörper enthalten⁵. Außerdem werden Anti-Histon-Antikörper gegen H3 und H4 mit der indirekten Immunfluoreszenzmethode nicht nachgewiesen. Aufgrund der Einschränkungen letzterer Methode ist die ELISA-Methode die erste Wahl für den Nachweis von Anti-Histon-Antikörpern.

Anti-Histon-Antikörper treten in etwa 50% der nicht selektierten SLE-Seren und bei 83% von Patienten mit aktivem SLE auf⁶. Fast alle Patienten mit arzneimittelinduziertem LE und 22% der Patienten mit arzneimittelinduzierten ANA zeigen positive Ergebnisse bei Anti-Histon-Antikörper-Tests¹. Außer bei idiopathischem und arzneimittelinduziertem SLE treten Anti-Histon-Antikörper auch bei etwa 10-15% von Patienten mit rheumatoider Arthritis und bei Patienten mit Mischkollagenose (MCTD) und Sklerodermie auf. Im Vergleich zu rheumatoider Arthritis, MCTD und Sklerodermie sind die Konzentrationen der Anti-Histon-Antikörper bei idiopathischem und arzneimittelinduziertem SLE sehr viel höher.

Mit der Einführung der ELISA-Methode wurde nachgewiesen, dass Anti-Histon-Antikörper sowohl dem Isotyp IgG als auch dem Isotyp IgM angehören können. Bei idiopathischem SLE treten sowohl IgG- als auch IgM-Anti-Histon-Antikörper auf. Es wurde auch über einen Zusammenhang zwischen der Konzentration der IgG-Anti-Histon-Antikörper und dem Schweregrad des Lupus berichtet³⁻⁶. Bei arzneimittelinduziertem LE schwankt die Häufigkeit der Anti-Histon-Antikörper der einzelnen Klassen. So gehören z.B. die Anti-Histon-Antikörper im Fall eines durch Procainamid oder Hydralazin induzierten LE vorwiegend der IgM-Klasse an⁴.

TESTPRINZIP

Der Anti-Histon-Antikörper-Test wird als Festphasen-Immuntest (ELISA) durchgeführt. Die Mikrotiterplattenvertiefungen werden mit verschiedenen Arten von Histon-Antigenen beschichtet. Anschließend werden die unreaktierten Stellen blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibratoren und Serumproben von Patienten werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert; dies erlaubt die Bindung der im Serum vorhandenen Anti-Histon-Antikörper. Nicht gebundene Antikörper und andere Serumeiweiße werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. An die Vertiefungen gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines polyvalenten enzymmarkierten Anti-human-Konjugats in die Vertiefungen nachgewiesen. Die enzymkonjugierten Antikörper binden sich spezifisch an das menschliche Immunglobulin. Nicht gebundenes Enzymkonjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antikörpern gegen Histon wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in ELISA-Einheiten (EU/ml) angegeben.

REAGENZIEN

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.**

Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis⁹.

WARNUNG – Natriumazid (NaN₃) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer. Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

Mitgelieferte Materialien

ImmuLisa™ Histon-Antikörper-ELISA (AHA) **REF** 1119

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen

| | | |
|------------|---|--|
| 12 x 8 | MICROPLATE AHA | Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit Histon-Antigen beschichtet. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR A AHA * | Gebrauchsfertiger Kalibrator A (<i>grüne Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Histon. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR B AHA * | Gebrauchsfertiger Kalibrator B (<i>lila Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Histon. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR C AHA * | Gebrauchsfertiger Kalibrator C (<i>blaue Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Histon. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR D AHA * | Gebrauchsfertiger Kalibrator D (<i>gelbe Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Histon. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL + AHA * | Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (<i>rote Kappe</i>). Enthält Histon-positives Humanserum. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL - * | Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (<i>weiße Kappe</i>). Enthält Humanserum. |
| 1 x 12 ml | IgG/IgM-CONJ ALKPHOS * | Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa. |
| 1 x 60 ml | DIL * | Gebrauchsfertiger Serumverdünner . Farbkennzeichnung blau. |

DE

1 x 12 ml **SUBSTRATE** *

Gebrauchsfertiges **Enzysubstrat**. Enthält pNPP. **Vor Licht schützen.**

1 x 12 ml **STOP**

Gebrauchsfertige **Stopplösung**.

2 x **BUF WASH**

Waschpuffer in Pulverform. Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.


* Enthält <0,1% NaN₃

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

LOT Chargennummer

REF Bestellnummer

 Verwendbar bis

 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

IVD In-vitro-Diagnostikum

 Hersteller

 Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 630 nm eingestellt werden.
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 28°C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig den Beipacktext, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Warten Sie vor Beginn des Testverfahrens, bis die Serumproben und Testreagenzien Raumtemperatur erreicht haben. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.

- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.
- Eine gute Waschmethode ist unerlässlich. Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschpuffer über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.

Testmethode

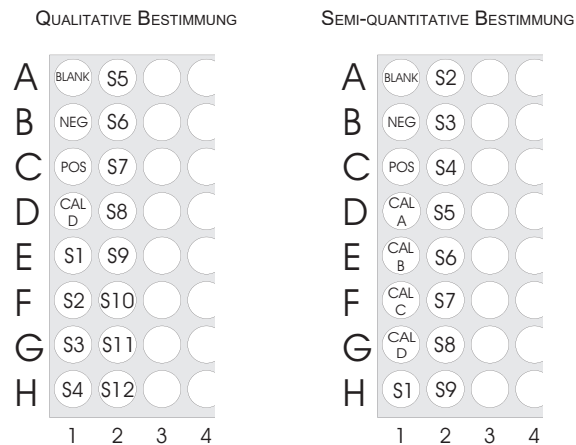
Schritt 1 Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.

Schritt 2 Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.

Schritt 3 Verwenden Sie für eine **qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen niedrigen Kalibrator D (*Fläschchen mit gelber Kappe*).

oder Verwenden Sie für eine **semi-quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis D, wie in der Beispielanordnung unten angezeigt.

Schritt 4 Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit **0,5 ml** Probenverdünner vermischen.



Schritt 5 Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank.

Schritt 6 Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.

Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null.

DE

- Schritt 7** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 8** Waschen Sie **viermal** mit Waschpuffer. Wenn Sie manuell waschen, füllen Sie jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.
- Schritt 9** Pipettieren Sie **100 μ l** Konjugat in die Vertiefungen.
- Schritt 10** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 11** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 8 beschrieben.
- Schritt 12** Pipettieren Sie **100 μ l** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.
- Schritt 13** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 14** Pipettieren Sie **100 μ l** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie den Extinktionswert innerhalb 1 Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.
- Schritt 15** Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **405 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 405/630 nm.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte $<0,3$ sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss weniger als 20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die Konzentration der Histon-Antikörper zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

ERGEBNISSE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Ext. der Testprobe

----- X EU/ml von Kalibrator D = EU/ml der Testprobe

Ext. von Kalibrator D

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.

DE

Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte zu bestimmen, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

Interpretation

Die Grenzwerte wurden erhalten, indem Seren von 100 normalen Blutspendern auf AHA getestet wurden. Die Grenzwerte wurden durch Berechnung des mittleren EU/ml-Wertes festgelegt. Werte von weniger als 2 Standardabweichungen von diesem Wert wurden als negativ gewertet, Werte zwischen 2-3 Standardabweichungen als ungewiss. Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Auslegung der Laborergebnisse. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte bestimmen. Diese können je nach der untersuchten Patientenpopulation schwanken.

| AHA-Wert | Interpretation |
|-----------------|---------------------------|
| < 20 EU/ml | negativ |
| 20-25 EU/ml | unbestimmt (Grenzbereich) |
| >25 EU/ml | positiv |

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Der ImmuLisa™ AHA-Test sollte nicht an stark hämolytierten, mikrobiell verunreinigten oder lipämischen Proben durchgeführt werden. Diese Methode sollte nur verwendet werden, um menschliche Serumproben zu testen. Die erhaltenen Ergebnisse dienen nur als Hilfsmittel bei der Diagnose und sollten nicht allein als diagnostisch gedeutet werden.

ERWARTETE WERTE

Die Häufigkeit von AHA bei verschiedenen Krankheiten ist untenstehend angezeigt

Häufigkeit von Anti-Histon-Antikörpern

| Krankheit | Häufigkeit % |
|----------------------------------|---------------------|
| Systemischer Lupus erythematodes | 42 |
| Arzneimittelinduzierter LE | 100 |
| Arzneimittelinduzierte ANA | 22 |
| Rheumatoide Arthritis | 15 |
| Sklerodermie | 10 |
| Mischkollagenose | 15 |
| Sjögren-Syndrom | 28 |
| Normale Patienten | 0 |

LEISTUNGSMERKMALE

Genauigkeit:

Die intraserialen und interserialen Variationskoeffizienten des AHA-Testsystems wurden mit Hilfe von positiven Proben mit unterschiedlichen AHA-Konzentrationen bestimmt und lagen zwischen 5-10%.

| AHA EU/ml | % VK |
|------------------|-------------|
| intraserial | |
| 66,0 | 6,9 |
| 93,0 | 9,5 |
| 72,0 | 7,2 |
| interserial | |
| 83,8 | 9,3 |
| 73,3 | 5,2 |

DE

Der ImmuLisa™ AHA-Testkit wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Anti-Histon-ELISA-Testkit verglichen. Insgesamt 129 Seren, die von einem klinischen Referenzlabor mittels Immunfluoreszenz als positiv oder negativ für Anti-Histon-Antikörper identifiziert wurden, wurden bezogen und gleichzeitig mit beiden Kits getestet. Der klinische Zustand der Patienten war unbekannt. Alle Seren wurden entsprechend den vom Hersteller empfohlenen Leistungs- und Qualitätskontrollverfahren getestet. Die relative Spezifität, die relative Sensitivität und die Übereinstimmung sind in der nachfolgenden Tabelle angezeigt:

| | | Vergleich zwischen AHA-ELISA-Methoden | | |
|--------------------------|----------------|--|----------------|---------------|
| | | ImmuLisa™ AHA | | |
| | | Positiv | Negativ | Gesamt |
| Anderer ELISA | Positiv | 36 | 4 | 40 |
| | Negativ | 14 | 75 | 89 |
| | Gesamt | 50 | 79 | 129 |

Übereinstimmung: 86%
Sensitivität: 90%
Spezifität: 84%



Anticorps anti-histone (AHA) ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1119 *Anticorps Histone (AHA) ELISA 96 Tests*

USAGE PRÉVU

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA destinée à la détection et à la semi-quantification des anticorps anti-histone dans le sérum humain.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les anticorps de l'histone, une protéine associée à l'ADN dans le noyau des cellules eucaryotiques, se manifestent dans plusieurs conditions cliniques mais essentiellement dans le lupus érythémateux systémique (SLE), le lupus érythémateux provoqué par des médicaments et chez les patients avec anticorps antinucléaire positif provoqué par des médicaments¹⁻⁸. Il existe plusieurs essais pour la détection des anticorps anti-histone mais l'immunofluorescence indirecte et la méthode ELISA paraissent être plus spécifiques et ont été utilisés le plus fréquemment¹⁻⁸. Les méthodes par immunofluorescence indirecte, bien que spécifique pour l'anticorps anti-histone, ne peuvent être utilisées avec du sérum qui contient des anticorps anti-ADN. De plus, les anticorps anti-histone H3 et H4 ne sont pas détectés par la méthode de l'immunofluorescence indirecte. À cause des limites que présente ce dernier essai, la méthode ELISA est la méthode préférée pour la détection des anticorps anti-histone.

Les anticorps anti-histone se manifestent dans approximativement 50% du sérum non sélectionné de lupus érythémateux systémique et chez 83% des patients souffrant d'un lupus systémique érythémateux en cours⁶. Pratiquement tous les patients souffrant d'un lupus provoqué par médicaments et 22% des patients avec anticorps anti-nucléaires provoqués par médicaments sont positifs pour les anticorps anti-histone¹. En plus du lupus érythémateux idiopathique et provoqué par des médicaments les anticorps anti-histone se manifestent aussi chez approximativement 10-15% des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde et chez les patients souffrant d'une connectivité mixte (MCTD) et de sclérodémie. Les niveaux des anticorps anti-histone sont beaucoup plus élevés dans le lupus érythémateux idiopathique et provoqué par médicaments comparés à la polyarthrite rhumatoïde, à la connectivité mixte et à la sclérodémie.

Avec l'apparition de la méthode ELISA, on a constaté que les anticorps anti-histone sont aussi bien d'isotypes IgG qu'IgM. Dans le lupus érythémateux systémique, aussi bien des anticorps anti-histone IgG qu'IgM se manifestent. Une corrélation entre les niveaux d'anticorps anti-histone IgG et la gravité du lupus a également été signalée³⁻⁶. Cependant, dans le lupus érythémateux provoqué par médicaments, l'incidence des anticorps anti-histone de chaque classe varie. Par exemple, dans le lupus érythémateux provoqué par la procaïnamide et l'hydralazine, les anticorps anti-histone sont essentiellement de la classe IgM⁴.

PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Le test anticorps anti-histone est réalisé sous la forme d'un dosage immunologique sur phase solide (ELISA). Des microplaques à puits sont enduites avec des antigènes histone, suivi d'un blocage des sites inaltérés pour réduire l'agglutination non-spécifique. Les régulateurs, les calibreurs et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits enduits d'antigène qui permettent aux anticorps anti-histone qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques. Les anticorps agglutinés sont détectés en ajoutant un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain aux puits. Ces anticorps conjugués à l'enzyme se lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine. Le conjugué enzyme non-lié est éliminé par lavage. La phosphatase alcaline et son substrat spécifique (pNPP) est ensuite ajoutée aux puits et la présence d'anticorps de l'histone est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion de substrat pNPP. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA (EU)/ml.

RÉACTIFS

Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2°-8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas utiliser si les réactifs ne sont pas clairs ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20°-25°C) avant l'usage. Quand elle est entreposée à 2°-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration du kit. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée. Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

Précautions

Destiné à un usage diagnostique *in vitro*. Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux⁹.

AVERTISSEMENT – L'azide de sodium (NaN₃) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue d'Immco Diagnostics Inc. Il faut respecter de bonnes pratiques de laboratoire pour limiter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs au moment de la manipulation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Matériel fourni

ImmLISA™ anticorps Histone (AHA) ELISA **REF** 1119

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun

| | | |
|------------|---|--|
| 12 x 8 | MICROPLATE AHA | Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène histone |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR A AHA * | Etalon A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-histone. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR B AHA * | Etalon B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-histone. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR C AHA * | Etalon C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-histone. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR D AHA * | Etalon D (<i>couvercle jaune</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-histone. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL + AHA * | Contrôle positif (<i>couvercle rouge</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-histone. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL - * | Contrôle négatif (<i>couvercle blanc</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain. |
| 1 x 12 ml | IgG/IgM-CONJ ALKPHOS * | Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines . Code couleur rose. |
| 1 x 60 ml | DIL * | Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue. |

FR

1 x 12 ml **SUBSTRATE** *

Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. **Protéger de la lumière.**

1 x 12 ml **STOP**

Solution d'arrêt prête à l'emploi.

2 x **BUF WASH**

Tampon de lavage en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

* Contient <0.1% NaN₃

Symboles utilisés sur les étiquettes:

LOT Numéro de lot

REF Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant

 Température de conservation

 Lire les instructions d'utilisation

IVD Pour usage diagnostique In vitro

 Fabricant

 Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée
- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes de test
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant

Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 630 nm.

Nettoyeur automatique de microplaque en mesure de dispenser 200 µl

RÉCOLTE DES SPÉCIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pour un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine.. Dans le cas d'un stockage plus long, les échantillons de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROCÉDURE

Notes de procédure

Avant de commencer l'essai, il faut lire avec soin la brochure qui accompagne le produit.

Conserver les spécimens de sérum et les réactifs de test à température ambiante avant d'entreprendre la procédure de test. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.

Toutes les dilutions des échantillons patient doivent être préparées avant de commencer l'essai.

- Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. Si le lavage est réalisé manuellement, il est effectué de manière adéquate en dirigeant un flux énergétique de solution de lavage avec un flacon-laveur à pointe large à travers toute la microplaque. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit avoir lieu au même taux et selon la même séquence.
- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.

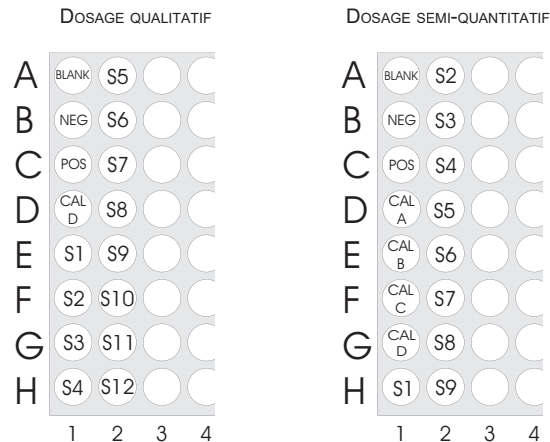
Méthode de test

Étape 1 Laisser tous les réactifs et les spécimens atteindre la température ambiante.

Étape 2 Étiqueter le feuillet de protocole pour indiquer l'emplacement des échantillons dans les puits. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.

Étape 3 Pour une détermination qualitative, utiliser seulement le Calibre Bas D prêt à l'emploi (*fiolle avec couvercle jaune*).

Ou Pour un **dosage semi-quantitatif**, utiliser les Calibres A à D prêts à l'emploi comme montré dans le schéma d'échantillon figurant ci-dessous.



Étape 4 Préparer une dilution **1:101** des échantillons patient en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec **0,5 ml** de diluant de sérum.

Étape 5 Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur.

Étape 6 Pipeter **100 µl** des calibres prêts à l'emploi, des régulateurs positifs et négatifs et des échantillons patients dilués dans les puits appropriés conformément au feuillet de protocole.

Note : Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif à blanc. Mettre le lecteur ELISA à zéro par rapport au réactif à blanc.

Étape 7 Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

Étape 8 Laver **4x** avec de la solution de lavage. Pour le lavage manuel, remplir chaque micropuits d'une solution de lavage reconstituée. Éliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque puits ou en aspirant le liquide de chaque puits. Pour absorber à la fin du dernier lavage, renverser les

bandes et tapoter vigoureusement les puits sur les serviettes de papier absorbant. Dans le cas de dispositifs de lavage automatiques, programmer le dispositif de lavage en suivant les instructions du fabricant.

- Étape 9** Pipeter **100 µl** de conjugué dans les microplaques à puits.
- Étape 10** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 11** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 8.
- Étape 12** Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrer comme pour le conjugué.
- Étape 13** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 14** Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puits en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de 1 heure après l'addition de la solution d'arrêt.
- Étape 15** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

Des calibreurs, des régulateurs positif et négatif et un réactif à blanc doivent être utilisés à chaque test pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif à blanc doit être inférieure à 0,3. Le calibreur A doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le régulateur négatif doit être inférieur à 20 EU/ml Si l'essai est effectué en double, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer la concentration d'anticorps anti-histone. Quand on procède aux tests qualitatifs, la densité optique du Calibreur D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs s'inscrivant dans la plage figurant sur la fiole.

RÉSULTATS

Calculs

Les concentrations des échantillons de patient peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

1. DOSAGE QUALITATIF

Abs. de l'échantillon d'essai

----- X EU/ml de calibreur D = EU/ml échantillon d'essai

Abs. du calibreur D

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption du Calibreur A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en EU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe meilleure. Déterminer les concentrations des échantillons de patient de la courbe par rapport à sa valeur d'absorption correspondante.

Calibreur

Les calibreurs prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patient qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux du calibreur A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent en outre être dilués de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe du calibreur quand on refait l'essai. Pour la détermination EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

Interprétation

Les valeurs de cut-off ont été obtenues en testant le sérum sur 100 donateurs du sang normaux à la recherche d'anticorps anti-histone AHA. Les niveaux de cutoff ont été établis en déterminant la moyenne EU/ml. Les valeurs inférieures à 2 SD de cette valeur normale ont été considérées comme négatives et les valeurs entre 2-3 SD comme étant équivoques. Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales. Celles-ci peuvent varier en fonction de la population examinée.

Interprétation de la valeur AHA

< 20 EU/ml Négative

20-25 EU/ml Indéterminée (cas-limite)

>25 EU/ml Positive

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Le test ImmuLisa™ AHA ne devrait pas être exécuté sur des échantillons grossièrement hémolysés, contaminés du point de vue microbien ou lipémiques. Cette méthode doit uniquement être utilisée pour le test d'échantillons de sérum humain. Les résultats obtenus servent seulement comme aide dans le diagnostic et ne devraient pas être interprétés comme un diagnostic par eux-mêmes.

VALEURS ATTENDUES

L'incidence des AHA dans différents types de maladie est fournie ci-dessous :

Incidence des anticorps anti-histone

| Incidence | maladie % |
|---|------------------|
| Lupus érythémateux systémique | 42 |
| Lupus érythémateux provoqué par des médicaments | 100 |
| Anticorps anti-nucléaires provoqués par des médicaments ANA | 22 |
| Polyarthrite rhumatoïde | 15 |
| Sclérodermie | 10 |
| Connectivité mixte | 15 |
| Syndrome de Sjögren | 28 |
| Patients normaux | 0 |

DONNÉES DE RENDEMENT

Précision :

Le coefficient de variation intra et inter-dosage du système de test AHA a été déterminé en prenant des échantillons positifs de divers niveaux d'AHA et est apparu comme se situant entre 5-10%.

| AHA EU/ml | % C.V. |
|------------------|---------------|
| intra-dosage | |
| 66,0 | 6,9 |
| 93,0 | 9,5 |
| 72,0 | 7,2 |
| inter-dosage | |
| 83,8 | 9,3 |
| 73,3 | 5,2 |

FR

Le kit de test AHA Immulisa™ a été comparé avec un kit de test anti-histone ELISA disponible dans le commerce. Un total de 129 sérums, identifiés comme étant positifs ou négatifs par immunofluorescence de l'anticorps de l'histone par un laboratoire de référence clinique ont été obtenus et testés simultanément avec les deux kits. Les conditions cliniques des patients n'étaient pas connues. Tous les sérums ont été testés d'après les procédures de réalisation et de qualité recommandées par le fabricant. La spécificité relative, la sensibilité relative et l'accord sont fournis dans le tableau suivant :

| | | Comparaison entre les méthodes AHA ELISA | | |
|------------------------|----------------|---|----------------|--------------|
| | | Immulisa™ AHA | | |
| | | Positif | Négatif | Total |
| Autre ELISA | Positif | 36 | 4 | 40 |
| | Négatif | 14 | 75 | 89 |
| | Total | 50 | 79 | 129 |

Accord: 86%
Sensibilité: 90%
Spécificité: 84%



IMMCO
DIAGNOSTICS

Anticorpi Anti-istoni (AHA) ELISA

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1119 *Anticorpi Anti-istoni (AHA) ELISA 96 Determinazioni*

FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la rilevazione e la semiquantificazione di anticorpi anti-istoni (AHA) nel siero umano.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Gli anticorpi anti-istoni, proteine associate con il DNA nel nucleo di cellule eucariote, compaiono in una serie di condizioni cliniche, ma principalmente nel lupus eritematoso sistemico (LES), nel lupus eritematoso indotto da farmaci (LE) e in pazienti con positività agli anticorpi anti-nucleari indotta da farmaci¹⁻⁸. Esistono vari test per la rilevazione di anticorpi anti-istoni, ma i metodi in immunofluorescenza indiretta e ELISA sembrano essere i più specifici e vengono utilizzati con maggiore frequenza¹⁻⁸. I metodi in immunofluorescenza indiretta, malgrado siano specifici per gli anticorpi anti-istoni, non possono essere utilizzati per i sieri contenenti anticorpi anti-DNA⁵. Inoltre, gli anticorpi anti-istoni contro H3 e H4 non sono rilevati dal metodo per immunofluorescenza indiretta, e quindi il metodo ELISA sembra essere quello privilegiato per la rilevazione di anticorpi anti-istoni.

Gli anticorpi anti-istoni compaiono in circa il 50% di sieri LES non selezionati e nell'83% di pazienti con LES attivo⁶. Quasi tutti i pazienti con LE indotto da farmaci e il 22% dei pazienti con ANA indotti da farmaci risultano positivi per gli anticorpi anti-istoni¹. Oltre che in LE idiopatico e indotto da farmaci, gli anticorpi anti-istoni sono presenti anche in circa il 10-15% di pazienti con artrite reumatoide e in pazienti con malattia mista del tessuto connettivo (MCTD) e sclerodermia. I livelli di anticorpi anti-istoni sono molto più elevati nel LES idiopatico e indotto da farmaci rispetto all'artrite reumatoide, alla MCTD e alla sclerodermia.

Con l'avvento della metodologia ELISA, gli anticorpi anti-istoni sono stati riscontrati essere degli isotipi IgG e IgM. Nel LES idiopatico sono presenti anticorpi anti-istoni dell'isotipo IgG e IgM. È stata riportata una correlazione tra i livelli di anticorpi anti-istoni IgG e la gravità del lupus³⁻⁶. Tuttavia, nel LES indotto da farmaci, l'incidenza degli anticorpi anti-istoni di ciascuna classe varia. Per esempio, nel LES indotto da procainamide e idralazina, gli anticorpi anti-istoni sono prevalentemente di classe IgM⁴.

PRINCIPI DELLA METODICA

Il test per gli anticorpi anti-istoni viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con vari tipi di antigeni istonici; segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito, per ridurre i legami non specifici. Controlli, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, e ciò permette agli anticorpi anti-istoni presenti nel siero di legarsi. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati ai pozzetti vengono rilevati da un coniugato polivalente anti-IgG e IgM umane marcato con enzima aggiunto ai pozzetti. Questi anticorpi coniugati con enzima si legano in modo specifico alle immunoglobuline umane. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi anti-istoni viene rivelata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato pNPP. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in unità ELISA (EU/ml).

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.**

Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a

temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Le strisce con i pozzetti sono monouso.

Precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali⁹.

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN₃) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Seguire una buona prassi di laboratorio per ridurre al minimo la contaminazione microbica e crociata di reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Materiali forniti

Anticorpi Anti-istoni (AHA) ELISA ImmuLisa™ **REF** 1119

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

| | | |
|------------|-------------------------------|--|
| 12 x 8 | MICROPLATE AHA | Micropiastra con micropozzetti asportabili rivestiti con l'antigene istone. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR A AHA * | Calibratore A (<i>tappo verde</i>) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-istoni. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR B AHA * | Calibratore B (<i>tappo viola</i>) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-istoni. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR C AHA * | Calibratore C (<i>tappo blu</i>) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-istoni. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR D AHA * | Calibratore D (<i>tappo giallo</i>) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-istoni. |
| 1 x 1.5 ml | CONTROL + AHA * | Controllo Positivo (<i>tappo rosso</i>) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per istoni. |
| 1 x 1.5 ml | CONTROL - * | Controllo Negativo (<i>tappo bianco</i>) pronto all'uso. Contiene siero umano. |
| 1 x 12 ml | IgG/IgM-CONJ ALKPHOS * | Coniugato in Fosf. Alc. Polivalente anti IgG/IgM pronto all'uso ; di colore rosa. |
| 1 x 60 ml | DIL * | Diluente siero pronto all'uso; di colore blu. |
| 1 x 12 ml | SUBSTRATE * | Substrato Enzimatico pronto all'uso . Contiene pNPP. Proteggere dalla luce. |
| 1 x 12 ml | STOP | Soluzione di Stop pronta all'uso. |
| 2 x | BUF WASH | Tampone di Lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno. |

* Contiene < 0,1% NaN₃

Simboli usati sulle etichette:

-  Numero di lotto
-  Numero catalogo
-  Scadenza
-  Temperatura di conservazione
-  Leggere le istruzioni per l'uso
-  Uso diagnostico in vitro
-  Produttore
-  Numero di test

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua distillata o deionizzata
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Timer
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 630 nm.
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

RACCOLTA DEL CAMPIONE

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

PROCEDURA**Note sul test**

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i campioni e reagenti non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga su tutta la micropiastra. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e il tempo di incubazione più uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta di reagente.

IT

- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti dovrebbe essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
- Togliere le strisce necessarie dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati. Trasferire immediatamente la busta in frigo.

Metodo del test

- Fase 1** Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.
- Fase 2** Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Fase 3** Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Low Calibrator D pronto all'uso (fiala con tappo giallo), mentre per una determinazione **semi-quantitativa** usare i Calibratori da A a D pronti all'uso come illustrato nell'esempio di disposizione dei campioni riportato sotto:



- Fase 4** Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **0,5 ml** di Diluente del Siero.
- Fase 5** Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo.
- Fase 6** Pipettare **100 µl** di Calibratore pronto all'uso, di Controllo Positivo e Negativo e di campioni del paziente negli appositi pozzetti come indicato nello schema riportato sopra.
- Nota:** Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco.
- Fase 7** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Eliminare il liquido capovolgendo e sbattendo i contenuti da ciascun pozzetto o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e battere vigorosamente i pozzetti su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatico, programmare il dispositivo secondo le istruzioni del produttore.
- Fase 9** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 10** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 11** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 8.
- Fase 12** Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 13** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.

IT

Fase 14 Pipettare **100 µl** di Soluzione di stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.

Fase 15 Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

Controllo di Qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere <0,3. Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore a 20 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare la concentrazione di anticorpi anti-istoni, si deve prendere la media delle due letture. Se si eseguono le determinazioni qualitative, la densità ottica del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore dell'assorbanza del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA:

Assorbanza del campione del test

----- X EU/ml di Calibratore D = EU/ml del Campione

Assorbanza del calibratore D

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.

Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

Interpretazione

I valori cut-off sono stati ottenuti analizzando sieri di 100 donatori normali agli AHA. I livelli cut-off sono stati stabiliti determinando la media EU/ml. I valori inferiori di 2 DS rispetto al riferimento normale sono stati considerati negativi e i valori tra 2-3 DS come equivoci. Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali che possono variare in base alla popolazione esaminata.

| Valore AHA | Interpretazione |
|-------------|-----------------|
| < 20 EU/ml | Negativo |
| 20-25 EU/ml | Borderline |
| >25 EU/ml | Positivo |

LIMITAZIONI DEL TEST

Il test per gli AHA ImmuLisa™ non deve essere eseguito su campioni fortemente emolizzati, microbiologicamente contaminati o lipemici. Questa metodica deve essere usata per testare solo campioni di siero umano. I risultati ottenuti rappresentano unicamente un elemento di supporto alla diagnosi, considerati singolarmente non hanno valenza diagnostica.

VALORI ATTESI

L'incidenza degli AHA in una serie di patologie è illustrata di seguito:

Incidenza degli anticorpi anti-istoni

| Malattia | Incidenza % |
|---------------------------------------|-------------|
| Lupus eritematoso sistemico | 42 |
| LES indotto da farmaci | 100 |
| ANA indotti da farmaci | 22 |
| Artrite reumatoide | 15 |
| Sclerodermia | 10 |
| Malattia mista del tessuto connettivo | 15 |
| Sindrome di Sjögren | 28 |
| Individui normali | 0 |

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

Precisione:

Il coefficiente di variazione (CV) del test per gli AHA all'interno di uno stesso saggio tra un saggio e l'altro è stato determinato prendendo campioni con livelli variabili di AHA ed è risultato essere tra 5-10%.

| AHA EU/ml | % C.V. |
|---------------|--------|
| intra-analisi | |
| 66,0 | 6,9 |
| 93,0 | 9,5 |
| 72,0 | 7,2 |
| inter-analisi | |
| 83,8 | 9,3 |
| 73,3 | 5,2 |

Il kit per l'analisi degli AHA ImmuLisa™ è stato confrontato con un kit di analisi anti-istoni ELISA disponibile in commercio. Sono stati ottenuti da un laboratorio clinico di riferimento complessivamente 129 sieri identificati come positivi o negativi per gli anticorpi anti-istoni con il metodo per immunofluorescenza e testati simultaneamente con entrambi i kit. La condizione clinica dei pazienti non era nota. Tutti i sieri sono stati analizzati secondo le procedure di performance e di controllo qualità raccomandate dal produttore. La specificità, la sensibilità e la concordanza sono illustrate nella Tabella seguente:

| | | Comparazione tra i metodi AHA ELISA | | |
|----------------|----------|-------------------------------------|----------|--------|
| | | AHA ImmuLisa™ | | |
| Altro ELISA | Positivo | Positivo | Negativo | Totale |
| | Negativo | 36 | 4 | 40 |
| | Totale | 14 | 75 | 89 |
| | | 50 | 79 | 129 |

Concordanza: 86%
Sensibilità: 90%
Specificità: 84%



IMMCO
DIAGNOSTICS

ELISA Anticorpos Anti-Histona (AHA)

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1119 ELISA para Anticorpos Anti-Histona (AHA) 96 Determinações

APLICAÇÃO

É um teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a detecção e semiquantificação de anticorpos anti-histona em soro humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos anti-histona, uma proteína associada ao ADN do núcleo das células eucarióticas, ocorre em numerosas patologias clínicas mas principalmente no *lúpus eritematoso sistémico* (LES), lúpus eritematoso induzido por medicamentos e em doentes positivos a anticorpos anti-nucleares induzidos por medicamentos¹⁻⁸. Existem diversos testes para a detecção de anticorpos anti-histona mas a imunofluorescência indirecta e o ELISA parecem ser mais específicos e têm sido usados mais frequentemente¹⁻⁸. Os métodos de imunofluorescência indirecta, mesmo os mais específicos para anticorpos anti-histona, não podem ser usados com soros que contenham anticorpos anti-ADN⁵. Para além disso, os anticorpos anti-histona H3 e H4 não são detectados pelo método de imunofluorescência indirecta. Em virtude das limitações do teste acima mencionado, o método ELISA tem sido o método escolhido para a detecção dos anticorpos anti-histona.

Os anticorpos anti-histona apresentam-se em aproximadamente 50% dos soros de doentes com LES não seleccionados e em 83% dos doentes com LES activo⁶. Quase todos os doentes com lúpus eritematoso induzido por medicamentos e 22% dos doentes com ANA induzidos por medicamentos são positivos a anticorpos anti-histona¹. Em conjunto com o lúpus eritematoso idiopático e induzido por medicamentos, os anticorpos anti-histona também se apresentam em aproximadamente 10 a 15% dos doentes com artrite reumatóide e nos doentes com doença mista do tecido conjuntivo (DMTC) e esclerodermia. Os níveis de anticorpos anti-histona são muito superiores no lúpus eritematoso idiopático e induzido por medicamentos se comparado com a artrite reumatóide, DMTC e esclerodermia.

Com o aparecimento do método ELISA, os anticorpos anti-histona foram descobertos como sendo de ambos os isotipos IgG e IgM. No LES idiopático apresentam-se ambos os anticorpos anti-histona, IgG e IgM. Também foi registada uma correlação entre os níveis de anticorpos IgG anti-histona e a gravidade de lúpus³⁻⁶. Todavia, no lúpus eritematoso induzido por medicamentos, varia a incidência de anticorpos anti-histona de cada classe. Por exemplo, no lúpus eritematoso induzido por procainamida e hidralazina, os anticorpos anti-histona são predominantemente da classe IgM⁴.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste de anticorpos anti-histona é executado como um exame imunológico de fase sólida (ELISA). Os micropoços são revestidos com diversos tipos de antigénio histona seguido pelo bloqueio dos locais não reactivos para reduzir a ligação não específica. As amostras de controlo, calibradores e soro do doente são incubados nos poços revestidos com antigénio o que permite a ligação dos anticorpos anti-histona presentes no soro. Os anticorpos que não se ligaram e as outras proteínas do soro são eliminadas com a lavagem dos micropoços. Os anticorpos que se ligaram aos micropoço são detectados juntando aos micropoços um conjugado de IgG anti-humana marcado com enzima. Os anticorpos conjugados com enzima ligam-se especificamente à imunoglobulina humana. O conjugado enzimático que não se liga é eliminado por lavagem. Depois adiciona-se aos micropoços um substrato enzimático específico (pNPP) e a presença de anticorpos anti-histona é detectada por uma alteração de cor provocada pela conversão do substrato pNPP. A reacção é interrompida e a intensidade da cor altera-se, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, e é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são apresentados em unidades ELISA por mililitro (UE/ml).

REAGENTES

Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congele.**

Não utilize o reagente se não estiver límpido ou se apresentar precipitação. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20-25 °C) no momento da utilização. Quando é conservado entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade indicada no kit. Reconstitua o tampão de lavagem em 1 litro de água destilada ou desionizada. As tiras de micropoços revestidas só devem ser utilizadas uma vez.

Precauções

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais¹².

AVISO: A azida de sódio (NaN₃) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação dessas azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

As instruções devem ser seguidas exactamente como estão indicadas no folheto do kit para assegurar resultados válidos. Não misture componentes do kit com componentes de outras origens que não sejam do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Respeite as normas em vigor em matéria de processos laboratoriais para minimizar as possibilidades de contaminação microbiana ou química dos reagentes durante o seu manuseamento. Não use após a data de validade indicada no rótulo.

Materiais fornecidos

ELISA para Anticorpos Anti-Histona (AHA) ImmuLisa™ REF 1119

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.






| | | |
|------------|--|---|
| 12 x 8 | MICROPLATE AHA | Microplaca com micropoços individuais destacáveis revestidos com antigénio histona. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR A AHA * | Calibrador A pronto a usar (<i>tampa verde</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-histona. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR B AHA * | Calibrador B pronto a usar (<i>tampa violeta</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-histona. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR C AHA * | Calibrador C pronto a usar (<i>tampa azul</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-histona. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR D AHA * | Calibrador D pronto a usar (<i>tampa amarela</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-histona. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL + AHA * | Controlo positivo pronto a usar (<i>tampa vermelha</i>). Contém soro humano positivo para histona. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL - * | Controlo negativo pronto a usar (<i>tampa branca</i>). Contém soro humano. |

PT

| | | |
|-----------|--------------------------------------|---|
| 1 x 12 ml | IgG/IgM-CONJ ALKPHOS * | Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa. |
| 1 x 60 ml | DIL * | Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul. |
| 1 x 12 ml | SUBSTRATE * | Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz. |
| 1 x 12 ml | STOP | Solução de paragem pronta a usar. |
| 2 x | BUF WASH | Tampão de lavagem em pó. Reconstituir cada unidade em um litro. |

* Contém <0,1% NaN₃

Símbolos utilizados nos rótulos:

| | |
|---|------------------------------------|
| LOT | Número de lote |
| REF | Número de catálogo |
|  | Prazo de validade |
|  | Temperatura de armazenamento |
|  | Ler as instruções de utilização |
| IVD | Utilização em diagnóstico in vitro |
|  | Fabricante |
|  | Número de testes |

Materiais necessários mas não fornecidos

- Água destilada ou desionizada
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Pipetas para 5 a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorvente

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o rendimento do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras de 2 a 8 °C e por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

PROCEDIMENTO

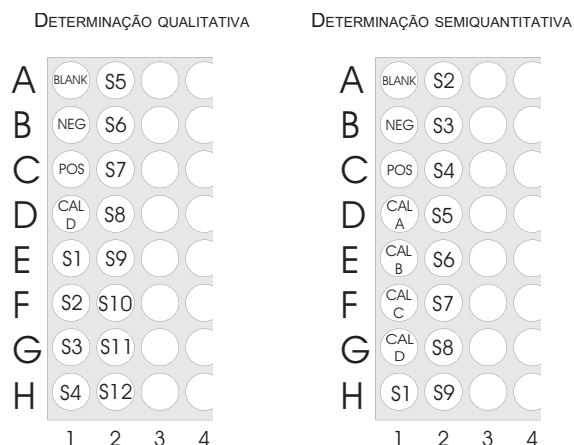
Notas sobre o modo de proceder

- Leia atentamente o folheto do produto antes de iniciar o teste.
- Deixe que as amostras de soro e os reagentes do teste estabilizem à temperatura ambiente antes de iniciar o teste. Guarde imediatamente no frigorífico todas as amostras e reagentes que não forem utilizados.

- As diluições das amostras do doente devem ser todas preparadas antes de iniciar o teste.
- É essencial uma boa técnica de lavagem. Se a lavagem for executada manualmente, o método de lavagem adequado é o de aplicar um jacto forte e directo de tampão de lavagem utilizando um frasco de lavagem com uma boca larga abrangendo toda a microplaca. **Aconselha-se um lavador automático de microplacas.**
- Use uma pipeta multicanal com capacidade de distribuição em 8 poços simultaneamente. Isso torna mais rápido o processo e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Em todos os passos é importante um cuidadoso controlo do tempo. O início de todos os períodos de incubação dá-se quando se adiciona o reagente.
- O adição de todas as amostras e reagentes deve ser efectuado com a mesma proporção e na mesma sequência.
- Retire do pacote as tiras de micropoços necessárias e feche bem o pacote para evitar condensação nos poços não utilizados. Guarde imediatamente o pacote no frigorífico.

Método do teste

- Passo 1 Deixe que todos os reagentes se estabilizem à temperatura ambiente.
- Passo 2 Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nos poços. É aconselhável executar o teste nas amostras em duplicado.
- Passo 3 Para uma **determinação quantitativa** use somente o Calibrador D baixo, pronto a usar (*frasco com tampa amarela*).
ou Para uma **determinação semiquantitativa** use os Calibradores A a D, prontos a usar, como descrito no esquema abaixo.



- Passo 4 Prepare uma diluição a **1:101** da amostra do doente misturando **5 µl** de soro do doente com **0,5 ml** de Diluente para Soro.
- Passo 5 Retire do pacote os micropoços necessários e guarde no frigorífico o pacote selado com as tiras não utilizadas.
- Passo 6 Com uma pipeta, deite **100 µl** de Calibradores prontos a usar, Controlos Positivos e Negativos e amostras do doente diluídas nos respectivos micropoços de acordo com a folha de protocolo.
Nota: Inclua também um micropoço com **100 µl** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente.
- Passo 7 Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 8 Lave **4 vezes** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Elimine o fluido virando ao contrário e batendo com os dedos para eliminar

PT

o conteúdo de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para enxugar no fim da última lavagem, vire as tiras ao contrário e bata com força as poços em toalhetes de papel absorvente. Em caso de lavadores automáticos, programe o lavador de acordo com as instruções do fabricante.

- Passo 9 Com uma pipeta, deite **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- Passo 10 Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 11 Lave todos os micropoços como no Passo 8.
- Passo 12 Com uma pipeta, deite **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempos, como descrito para o Conjugado.
- Passo 13 Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 14 Com uma pipeta, deite **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço na mesma ordem e tempos descritos para o Substrato Enzimático. Leia os valores de absorvância no prazo de 1 hora depois de juntar a Solução de Paragem.
- Passo 15 Leia a absorvância de cada micropoço a **405 nm** usando um leitor de microplacas de comprimento de onda simples ou duplo a 405/630 nm em comparação com o branco de reagente definido em absorvância zero.

Controlo de qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o branco de reagente devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvância do branco de reagente deverá ser $< 0,3$. O Calibrador A deverá ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário o teste deverá ser repetido. O controlo negativo deve ser < 20 UE/ml. Se o teste for efectuado em duplicado, para determinar a concentração de anticorpos a histona deverá ser calculada a média das duas leituras. Quando se efectuam determinações qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Para determinações semiquantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado no frasco.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras do doente podem ser determinadas em dois métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

----- X UE/ml de Calibrador D = UE/ml da Amostra de Teste

Abs. do Calibrador D

2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Registe a absorvância dos Calibradores A a D em relação à respectiva concentração num papel milimétrico linear. Registe a concentração em UE/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e trace a curva de melhor ajuste. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva em relação ao correspondente valor de absorvância.

Calibrador

Os calibradores prontos a usar são incluídos para assegurar uma semiquantificação e devem ser usados em todos os testes. As amostras dos doentes com níveis de anticorpos mais elevados devem dar valores de absorvância mais elevados do que os do Calibrador A. Para a determinação com precisão dos valores semiquantitativos essas amostras de soro devem ser mais diluídas de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando forem novamente testadas. Para a determinação de UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição.

PT

Interpretação

Os valores limites foram obtidos testando os soros de 100 dadores de sangue normais em AHA. Os níveis limites foram estabelecidos determinando a UE/ml média. Os valores inferiores a 2 DP em relação ao normal foram considerados negativos e os valores entre 2 e 3 DP foram considerados equívocos. As seguintes informações servem apenas como guia na interpretação dos resultados de laboratório. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais. Esses poderão variar em função da população examinada.

| Valor AHA | Interpretação |
|-------------|------------------------|
| < 20 EU/ml | Negativo |
| 20-25 EU/ml | Indeterminado (Limite) |
| >25 EU/ml | Positivo |

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

O teste de AHA ImmuLisa™ AHA não deve ser efectuado em amostras muito hemolisadas, contaminadas com micróbios ou lipêmicas. Este método só deve ser utilizado para testar amostras de soro humano. Os resultados obtidos servem apenas como auxílio do diagnóstico e não deverão ser interpretados como um diagnóstico definitivo.

VALORES PREVISTOS

A incidência de AHA em diversas condições de doença está abaixo indicada:

Incidência de Anticorpos Anti-Histona

| Doença | Incidência % |
|----------------------------------|--------------|
| Lúpus eritematoso sistémico | 42 |
| LE induzido por medicamentos | 100 |
| ANA induzidos por medicamentos | 22 |
| Artrite reumatóide | 15 |
| Escleroderma | 10 |
| Doença mista do tecido conectivo | 15 |
| Síndrome de Sjögren | 28 |
| Indivíduos normais | 0 |

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Precisão:

O coeficiente de variação intra- e inter-testes do sistema de teste de AHA foi determinado utilizando amostras positivas com diversos níveis de AHA e foi de 5 a 10%.

| AHA UE/ml | % C.V. |
|-------------|--------|
| intra-teste | |
| 66,0 | 6,9 |
| 93,0 | 9,5 |
| 72,0 | 7,2 |
| inter-teste | |
| 83,8 | 9,3 |
| 73,3 | 5,2 |

O Kit de teste de AHA ImmuLisa™ foi comparado com outro kit de teste ELISA para anticorpos anti-histona obtido no comércio. Foi obtido e testado simultaneamente com ambos os kits por um laboratório de referência clínica um total de 129 soros identificados como positivos ou negativos por imunofluorescência de anticorpos anti-

PT

histona. As condições clínicas dos doentes eram desconhecidas. Todos os soros foram testados de acordo com o desempenho e controlo de qualidade recomendados pelo fabricante. A especificidade relativa, sensibilidade relativa e concordância estão indicadas na Tabela seguinte:

| | | Comparação entre os Métodos ELISA AHA | | |
|--------------------|-----------------|--|-----------------|--------------|
| | | AHA ImmuLisa™ | | Total |
| Outro ELISA | Positivo | Positivo | Negativo | |
| | Positivo | 36 | 4 | 40 |
| | Negativo | 14 | 75 | 89 |
| Total | 50 | 79 | 129 | |

Concordância: 86%
Sensibilidade: 90%
Especificidade: 84%

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Epstein A, Greenberg M, Halbert S, Kramer L and Barland P. The clinical application of an ELISA technique for the detection of anti-histone antibodies. *J Rheumatol* 13:304-307, 1986.
2. Cohen MG, Pollard KM, Webb J. Antibodies to histone in systemic lupus erythematosus, prevalence, specificity and relationship to clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis* 51:61-66, 1992.
3. Gompertz NR, Isenberg DA, Turner BM. Correlation between clinical features of systemic lupus erythematosus and levels of anti-histone antibodies of the IgG, IgA, and IgM isotypes. *Ann Rheum Dis* 49:524-527, 1990.
4. Rubin RL. Antihistone antibodies. In "Systemic Lupus Erythematosus", Lahita RG, Ed, Wiley, New York, 271-289, 1987.
5. Portanova JP, Rubin RL, Joslin FG, Agneloo VD, Tan EM. Reactivity of antihistone antibodies induced by procainamide and hydralazine. *Clin Exp Immunol* 25:67-79, 1982.
6. Gioud M, Aitkaci M, Monier JC. Histone antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum*: 25:407-413, 1982.
7. Costa O, Monier JC. Anti-histone antibodies detected by ELISA and immunoblotting in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 13:722-725, 1986.
8. Aitkaci, Monier JC, Mamelle N. Enzyme-linked immunosorbent assay for anti-histone antibodies and their presence in systemic lupus erythematosus sera. *J Immun Methods* 44:311-322, 1987.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, (HHS Pub. No. (CDC) 93-8395) 1993.



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com