

## IDENTIENA Plus Kit

Test immunoenzimatico per l'identificazione degli anticorpi anti antigeni nucleari estraibili (ENA) ed anti ds-DNA nel siero umano



96 tests

IVD




(12 campioni X 7 parametri + 1 controllo) **Ref LPU40**



LOT

Sull'etichetta esterna

 2-8 °C

### SIGNIFICATO CLINICO E DESTINAZIONE D'USO

Gli antigeni intracellulari SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, RNP, Jo-1 e Scl-70 costituiscono il bersaglio della risposta autoimmune in molti pazienti affetti da malattie reumatiche. Gli anticorpi anti SSA-/Ro sono presenti nel 30-50 % dei pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (SLE) ed in circa il 95 % dei pazienti affetti da Sindrome di Sjögren (SS). Gli anticorpi anti SS-B sono anch'essi associati al SLE ed alla SS. Gli anti Smith sono altamente specifici per il SLE e sono evidenziabili in circa il 30-40 % dei pazienti. Gli anticorpi anti RNP vengono riscontrati, solitamente ad alto titolo, nella quasi totalità dei pazienti affetti da Malattia Mista del Tessuto Connettivo (MCTD), ma possono anche essere associati a SLE, SS e Sclerodermia. Gli anticorpi anti Jo-1 vengono considerati specifici della Polimiosite e della Dermatomiosite. Gli anticorpi anti Scl-70 sono riconosciuti quali marker primari della Sclerosi Sistemica Progressiva (PSS o Sclerodermia). Gli anticorpi anti DNA a doppia elica (ds-DNA) sono presenti, unitamente ad una vasta gamma di anticorpi diretti contro svariate componenti del nucleo cellulare, nel Lupus Eritematoso Sistemico. Nei pazienti affetti da SLE il livello di anticorpi anti ds-DNA può essere utilizzato per monitorare l'attività della malattia, in quanto è stato osservato che un rapido incremento frequentemente precede l'esacerbazione della malattia, mentre una caduta del titolo anticorpale spesso è conseguente alla terapia farmacologica. Gli anticorpi anti ds-DNA non vengono riscontrati nel siero dei pazienti affetti da SLE farmacodotto. Il kit Identiena Plus contiene una piastra microwell con adesivo nel primo pozzetto (identificabile a partire dall'estremità della strip contrassegnata in blu) un pool dei quattro antigeni ENA di riscontro più frequente: SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, RNP; e nei successivi pozzetti i singoli antigeni disposti nel seguente ordine a partire dal secondo pozzetto: RNP, Smith, SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70, Jo-1, ds-DNA. Può quindi essere efficacemente utilizzato per identificare la specificità antigenica di pazienti positivi per la presenza di anticorpi anti antigeni nucleari estraibili (ENA) ed anti ds-DNA.

### PRINCIPIO DEL METODO

Il kit Identiena Plus è un test immunoenzimatico in fase solida, o ELISA, per l'identificazione di anticorpi specifici anti antigeni nucleari estraibili ed anti ds-DNA in campioni serici. La reazione immunologica avviene in due passaggi. Nel primo passaggio il campione viene incubato contemporaneamente nei sette pozzetti, in ciascuno dei quali è adesivo uno dei sei antigeni nucleari estraibili (ENA) più noti o il

ds-DNA. Nel pozzetto contenente il pool può essere dispensato il controllo positivo o il controllo negativo.

Nel secondo passaggio avviene la formazione del complesso tra gli autoanticorpi specifici legati all'antigene ed il coniugato enzimatico anti Ig G umane o anti Ig G/Ig M nel caso del pozzetto contenente il ds-DNA.

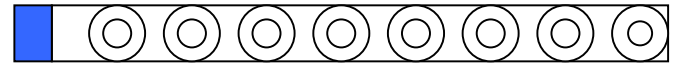
Dopo lavaggio ed eliminazione dei componenti in eccesso, la presenza del complesso autoanticorpo del paziente-coniugato enzimatico viene evidenziata attraverso la reazione enzimatica dell'HRP sul substrato/cromogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB).

In presenza di anticorpi anti ENA o anti ds-DNA viene generata una colorazione la cui intensità è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi stessi nel campione.

### CONTENUTO DELLA CONFEZIONE

**Strip Microwells** montate su porta strip con adesivo nel primo pozzetto (a partire dall'estremità contrassegnata in blu) un pool di SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, RNP e nei successivi sette pozzetti i sei antigeni singoli ed il ds-DNA nel seguente ordine:

- RNP
- Smith
- SS-A/Ro
- SS-B/La
- Scl-70
- Jo-1
- Ds-DNA



Pool RNP Smith SSA SSB Scl-70 Jo-1 DNA

Quantità Ref SMEPP 00 12 strips da 8 micropozzetti

**Controllo Positivo** – Flacone contenente siero umano positivo per la presenza di anticorpi anti antigeni nucleari estraibili diluito in tampone stabilizzante, contiene Sodio Azide 0.09%. Pronto all'uso.

Volume Ref CPEP 00 1.5 ml

**Controllo Negativo** – Flacone contenente siero umano negativo per la presenza di anticorpi anti antigeni nucleari estraibili diluito in tampone stabilizzante, contiene Sodio Azide 0.09%. Pronto all'uso.

Volume: 1.5 ml Ref CNE00

**Soluzione di Lavaggio** - Flacone contenente tampone salino concentrato 10x. Contiene Thimerosal 0.01 % e tensioattivi. Diluire prima dell'uso.

Volume Ref TL 00 100 ml

**Coniugato Enzimatico G-** Flacone contenente antisiero di coniglio anti Ig G umane, marcato con HRP in soluzione proteica tamponata. Pronto all'uso.

Volume Ref CEEPP 00 13.0 ml

**Coniugato Enzimatico GM-** Flacone contenente antisiero di coniglio anti Ig G ed Ig M umane, marcato con HRP in soluzione proteica tamponata. Pronto all'uso.

Volume Ref CEEPPGM 00 2.0 ml

**Diluente Campione-** Flacone contenente soluzione tamponata per la diluizione dei campioni sierici. Contiene BSA 0.25 % e Thimerosal 0.01 % come conservanti.

Volume Ref DCE 00 50 ml

REF	Rev	Dat.	Pag.
INSLPU40	00	19/03/04	1/7

**Cromogeno/Substrato** - Flacone contenente soluzione tamponata pronto uso di 3,3',5,5', tetrametil-benzidina e perossido d'idrogeno con stabilizzanti ed attivatori. *Attenzione - Proteggere dalla luce.*

Volume Ref CS 00 13 ml

**Soluzione Bloccante** - Flacone contenente acido solforico 0.3 M. *Irritante! Manipolare con cautela.*

Volume Ref SS 00 13 ml

**Pellicola adesiva** - Adesivo di plastica trasparente per ricoprire la piastra durante l'incubazione.

Quantità: 2

**Istruzioni d'uso** (Ref INSLPU40 00) – Il presente documento.

**Spiegazione simboli** (Ref SIM 00) – Lista dei simboli.

**Nota** - **Tutti i materiali d'origine umana sono stati controllati e certificati dal fornitore come negativi per HBsAg e anticorpi anti-HIV1&2 e anti-HCV.**

### PREPARAZIONE DEI REATTIVI

**Soluzione di Lavaggio** - Diluire 1:10 con acqua distillata o deionizzata e miscelare con cura prima dell'uso.

### CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REATTIVI

- Il kit deve essere conservato a 2 - 8 °C ed utilizzato entro la data di scadenza riportata sull'etichetta.
- La busta contenente la micropiastra deve essere portata a temperatura ambiente prima dell'apertura. Prelevare le strip necessarie per il test in corso e riporre le strip rimanenti nella busta, in presenza d'essiccante, quindi sigillare ermeticamente e conservare a 2 - 8 °C. Così conservate le strip sono stabili per 1 mese, dopo l'apertura della busta.
- La Soluzione di Lavaggio diluita può essere conservata a temperatura ambiente per 1 mese.
- Il Cromogeno/Substrato è fotosensibile; non esporlo a luce diretta.
- Gli altri reattivi liquidi possono essere utilizzati ripetutamente fino ad esaurimento se conservati a 2 - 8 °C e trattati in modo da ridurre le contaminazioni ambientali.

### MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO

I seguenti materiali non sono contenuti nel kit, ma sono richiesti per l'esecuzione del test:

- Acqua distillata o deionizzata
- Pipette di precisione da 10, 100, 200 e 1000 µl con appositi puntali monouso
- Carta assorbente
- Sistema di lavaggio micropiastre automatico o manuale in grado di aspirare e dispensare volumi di 300 - 400 µl.
- Lettore Elisa di micropiastre fornito di filtri 450 nm e 620 nm.

### PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- Tutti i reattivi presenti nel kit sono esclusivamente intesi per uso diagnostico "in vitro".
- Per l'uso dei reattivi e del materiale del laboratorio attenersi alla Buona Pratica del Laboratorio (GLP).
- I campioni e i materiali potenzialmente infetti devono essere maneggiati con cura perché potrebbero trasmettere infezioni.
- Evitare ogni contatto della pelle e delle mucose con i reattivi. Utilizzare per l'analisi guanti protettivi monouso.

In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua le parti esposte.

### PRECAUZIONI TECNICHE

- La procedura deve essere eseguita con attenzione per ottenere risultati corretti.
- Non utilizzare il kit o i suoi componenti oltre la data di scadenza riportata sulle etichette. Non mescolare reagenti di lotti diversi.
- Evitare ogni contaminazione dei reattivi al momento del prelievo dai flaconi. Si raccomanda di utilizzare pipette con puntali monouso. Dispensare i reattivi sul fondo dei pozzetti evitando schizzi e contatti con i bordi in modo da ridurre al minimo la possibilità di fenomeni di contaminazione crociata.
- Almeno 1 ora prima dell'uso, portare a temperatura ambiente tutti i reagenti necessari al dosaggio.
- Prelevare dalla micropiastra le strip necessarie, inserirle nell'apposito telaio e conservare le altre nella loro busta d'alluminio, accuratamente sigillata ed in presenza di essiccante, a 2 - 8 °C.
- Evitare lunghe interruzioni tra le fasi del test e mantenere gli stessi tempi di distribuzione ed incubazione per Controlli, campioni e reattivi.
- Si consiglia di ricoprire la piastra con l'apposita pellicola adesiva fornita nel kit, durante le incubazioni di 30 minuti.
- Il colore sviluppato nell'ultima incubazione è stabile per 30 minuti al buio.
- Si consiglia di coprire la piastra con l'apposita pellicola adesiva fornita con il kit, durante le due incubazioni di 30 minuti.
- Si raccomanda di leggere la micropiastra con un lettore ELISA in grado di sottrarre il fondo a 620-630 nm e leggere Controlli e campioni a 450 nm.
- Evitare che il Cromogeno/Substrato venga a contatto con agenti ossidanti o parti metalliche. Evitare inoltre l'esposizione a luce intensa durante l'incubazione. Per la dispensazione di tale reagente, si consiglia l'utilizzo di contenitori monouso in plastica o vetreria lavata prima con acido solforico 1N, quindi con acqua deionizzata.

### ISTRUZIONI DI LAVAGGIO

Una buona procedura di lavaggio è fondamentale per l'ottenimento di risultati analitici accurati e corretti. Si consiglia di usare un Lavatore di micropiastre di buona qualità, qualificato e mantenuto ad un ottimo livello di prestazioni meccaniche di lavaggio. Tararlo sul kit in oggetto in modo da raggiungere le caratteristiche analitiche dichiarate.

Nel caso di lavaggio manuale, si consiglia di effettuare 4 cicli di lavaggio, dispensando ed aspirando 400 µl/pozzetto per ciclo. In genere 4 cicli di lavaggio automatico da 400 µl/pozzetto ciascuno sono sufficienti per rimuovere false positività e fondo elevato.

*Attenzione –Per ottenere i migliori risultati si suggerisce di mantenere il liquido di lavaggio a contatto delle pareti del pozzetto per circa 30 secondi.*

REF	Rev	Dat.	Pag.
INSLPU40	00	19/03/04	2/7

### PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Diluire i campioni dei pazienti **1:101** con l'apposito diluente fornito nel kit. **NON** è necessario diluire i controlli presenti nel kit in quanto essi sono già forniti **PRONTI ALL'USO**.

### PROCEDURA CON IL METODO A TEMPERATURA AMBIENTE "18-30°C"

*Almeno 1 ora prima dell'uso, portare a temperatura ambiente tutti i reagenti necessari al dosaggio.*

1. **Dispensare 100 µl del controllo positivo o del controllo negativo pronto all'uso nel primo pozzetto e 100 µl del campione opportunamente diluito nei pozzetti dal secondo all'ottavo.**
2. **Incubare le strip per 30 ± 5 minuti a temperatura ambiente.**
3. **Lavare la micropiastra con la Soluzione di Lavaggio prediluita utilizzando un Lavatore automatico, secondo le raccomandazioni riportate sopra.**
4. **Dispensare 100 µl di Coniugato Enzimatico anti Ig G nei pozzetti dal primo al settimo di ciascuna strip e 100 µl di Coniugato Enzimatico anti Ig G/Ig M nell'ottavo pozzetto**
5. **Incubare le strip per 30 ± 5 minuti a temperatura ambiente**
6. **Lavare la micropiastra con la Soluzione di Lavaggio prediluita utilizzando un Lavatore automatico, secondo le raccomandazioni riportate sopra**
7. **Dispensare 100 µl di Cromogeno/Substrato in tutti i pozzetti. Incubare la micropiastra al riparo da intensa illuminazione per 10 minuti a temperatura ambiente.**
8. **Bloccare la reazione enzimatica dispensando in ogni pozzetto 100 µl di Soluzione Bloccante. Leggere l'estinzione a 450 nm e, facoltativamente, a 620 - 630 nm come riferimento.**

*Nota - La lettura della micropiastra deve essere eseguita non oltre 30 minuti dalla dispensazione della Soluzione Bloccante.*

### CRITERI DI ACCETTABILITA'

La prova è da ritenersi valida se:

- Il valore di OD 450 nm medio del Controllo Negativo è inferiore a 0.250. Valori abnormi si osservano con sistema di lavaggio difettoso o non tarato come descritto nella sezione apposita.
- Il valore di OD 450 nm medio del Controllo Positivo deve essere superiore a 1.500. Valori inferiori si osservano a

causa di una conservazione del kit in condizioni non ottimali di temperatura o di una procedura operativa scorretta.

- In caso la prova fosse non valida, ricontrollare le procedure di preparazione dei reattivi, la scadenza del kit, le sue condizioni di conservazione e l'efficienza del sistema di lavaggio/lettura, prima di ripetere il dosaggio.

### CALCOLO DEI RISULTATI

La determinazione degli autoanticorpi anti ENA e anti ds-DNA nel campione è valutata mediante il valore di densità ottica.

I campioni con OD 450 nm inferiore a 0.4 sono considerati negativi.

I campioni con OD 450 nm compresa tra 0.4 e 0.6 sono considerati in zona grigia.

I campioni con OD 450 nm superiori a 0.6 sono considerati positivi.

*Nota - Tutti i campioni inclusi nella zona grigia devono essere ripetuti con un test di conferma.*

#### Esempio di calcolo

Controllo Positivo	1.900	OD 450 nm
Campione #1	0.235	negativo
Campione #2	1.050	positivo
Campione #3	0.555	in zona grigia

### CARATTERISTICHE DEL TEST

**Sensibilità** - La sensibilità è stata calcolata utilizzando sieri di riferimento positivi (Immunovision, The Binding Site, Intergen Biodiagnostics, Biomedical Resources, Serologicals) per la presenza di anticorpi anti ENA o anti ds-DNA, diluiti serialmente in diluente campione come suggerito dal fornitore.

**Specificità** - Uno studio eseguito su una vasta casistica di 50 negativi provenienti da donatori e da individui sani, e di una costituita da campioni potenzialmente cross-reattivi ha permesso di identificare un valore di specificità superiore a 98 %

**Riproducibilità** - Una serie di campioni negativi, debolmente positivi e positivi sono stati controllati ripetutamente per determinare valori statistici di precisione e riproducibilità, valutandone la variabilità inter e intra saggio delle determinazioni.

Si sono osservati valori di CV sulle OD 450 nm mediamente inferiori al 10% per i valori OD 450 nm compresi tra 0.400 e 2.500.

### LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

I risultati ottenuti con l'esecuzione di questo saggio sono solo un aiuto diagnostico. Ciascun medico deve interpretare i risultati del test alla luce della storia del paziente, dei sintomi e di altri test diagnostici

### AUTOMAZIONE DELLA PROCEDURA

La procedura può essere programmata su strumenti automatici sotto la completa responsabilità del cliente, il quale si farà carico anche della validazione dei risultati. Per tutte le informazioni del caso, si raccomanda di rivolgersi direttamente al produttore dello strumento automatico.

### SMALTIMENTO

Fare riferimento alle leggi localmente in vigore.

REF	Rev	Dat.	Pag.
INSLPU40	00	19/03/04	3/7

## IDENTIENA Plus Kit

Qualitative Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the identification of antibodies against extractable nuclear antigens (ENA) and ds DNA in human serum



96 tests



(12 campioni X 7 parametri + 1 controllo) Ref LPU40



LOT

Sull'etichetta esterna

2-8 °C

### SUMMARY AND EXPLANATION

Antinuclear antibodies (ANA) are a group of autoantibodies against various cell nuclear antigens, which are considered to be quite useful as disease markers in autoimmune disorders. Although antibodies specific to DNA have a high correlation with SLE, antibodies to a number of other nuclear antigens appear to be of diagnostic and/or prognostic significance in SLE and other diseases such as Progressive Systemic Sclerosis, Mixed Connective Tissue Disease, Sjögren's Syndrome, and Polymyositis, making ENA testing useful not only for SLE, but also as a general diagnostic tool for connective tissue diseases. RNP antibody is an extractable nuclear antigen (ENA) antibody, present with high frequency in the sera of patients with collagen diseases such as SLE and mixed connective tissue disease (MCTD). MCTD is a clinical disease combining features of SLE, Progressive Systemic Sclerosis (PSS) and Polymyositis/Dermatomyositis (PM/DM). The presence of RNP antibody in the sera of patients is essential for the diagnosis of MCTD. RNP antibody, when present alone at high levels, is diagnostic of MCTD. Lower levels of anti-RNP, in conjunction with other autoantibodies may be observed in PSS, Sjögren's Syndrome (SS) and Rheumatoid Arthritis (RA). Sm antibody is an ENA antibody named after "Smith", a patient who suffered from Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Sm antibody is frequently found with RNP antibody. It is detected in 10-30% of SLE patients. At elevated titers, Sm antibody is indicative of SLE and is rarely detected in other diseases. It has been adopted as a marker for the diagnosis of SLE by the American Rheumatism Association (ACR). Anti-Sm is observed at a high titer in the active period of SLE and at a low titer in the nonactive period. Raynaud's phenomena and nephropathy are reported more frequently in SLE patients testing positive for anti-Sm. SSA antibody is an ENA antibody present in high frequency (88-96%) in the sera of patients with Sjögren's Syndrome (SS) and SLE (24-60%). SSA is also sometimes found in patients with Rheumatoid Arthritis, Myositis and Scleroderma. SS-B antibody is an ENA antibody present in high frequency (71-87%) in Sjögren's Syndrome and in lower frequency in SLE (9-35%). It has been confirmed that the SS-A and SS-B antibodies are identical with anti-Ro and anti-La respectively. SS-B antibodies are frequently associated with SS-A antibodies and are rarely detected alone. SS-B antibodies are seen almost exclusively in women; and, the presence of both SS-A and SS-B antibodies in mothers and infants are associated with skin lesions, neonatal lupus and congenital heart block. Scl-70 antibody is an ENA antibody present in high specificity in the

sera of patients with Progressive Systemic Sclerosis (PSS). The antigen of anti-Scl-70 is identified with topoisomerase I, one of the nuclear enzymes, thus Scl-70 antibodies are also called topoisomerase I antibodies. Scl-70 antibodies, as well as centromere antibodies, in the sera of patients are essential for diagnosis of PSS. PSS is classified as two types; diffuse scleroderma and limited scleroderma. Scl-70 antibodies are present specifically in diffuse scleroderma and centromere antibodies are present in limited scleroderma. Therefore, detection of both antibodies is useful for classification of PSS. Rarely, Scl-70 antibody is found in SLE and MCTD patients. Anti double stranded (ds) DNA antibodies are found in Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Anti dsDNA antibodies have been suggested to be directly involved in the disease process, being included in the ARA criteria for the diagnosis of the disease. In SLE patients, levels of anti-dsDNA antibodies can be used in the monitoring of disease activity, since rapid increases have been reported to precede exacerbation of the disease and the falls in antibody levels often accompany drug therapy. Anti-dsDNA antibodies are not detected in the sera of patients with drug induced lupus. Among the methodologies available to detect anti-ENA's are Immunoblot, Double Immunodiffusion (DID), Immunoprecipitation (IPP) and Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

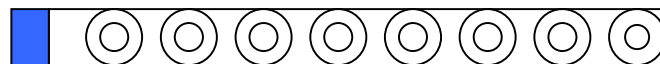
### PRINCIPLE OF METHOD

The ASTRA IDENTI-ENA Plus kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Patient samples are diluted 1:101 with a sample diluent and incubated in ENA coated microwells. Antibodies present in the sample will bind to the corresponding antigen on the microwell surface. Following washing the microwells, horseradish peroxidase conjugated anti-human immunoglobulin specific for IgG and specific for IgM and IgM (for the detection of anti dsDNA antibodies) is added and incubated. After washing the microwells to remove unbound conjugate, a chromogenic substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB) is added, resulting in a soluble coloured (blue) reaction solution, which intensity is proportional to the concentration of anti-ENA/anti dsDNA antibodies in the sample. Following the addition of a stop solution the patient's reactions are read.

### KIT CONTENTS

**Microwell strips** coated with a pool of natural and recombinant SS-A, SS-B, Sm, RNP antigen in the first well. Specific antigens were coated in the third-sixth well, and Scl-70, Jo-1 and dsDNA antigens in the sixth, seventh and eighth well respectively.

**Quantity:** 12 strips of 8 microwells Ref SMEPP00



Pool RNP Smith SSA SSB Scl-70 Jo-1 DNA

**Positive Control** – Vial containing ENA antibody positive diluted human serum with added 0.09% Sodium Azide. **Do not dilute, ready for use.**

**Negative Control** – Vial containing ENA antibody negative diluted human serum with added 0.09% Sodium Azide. **Do not dilute, ready for use.**

Ref CPEP00

REF	Rev	Dat.	Pag.
INSLPU40	00	19/03/04	4/7

*Volume:* 1.5 ml Ref CNE00  
**Wash Solution** – Bottle containing 10x-concentrated saline solution with added Thimerosal 0.01 % and surfactant. **Dilute before use.**

*Volume:* 100 ml Ref TL00  
**Enzyme ConjugateG** – Vial containing buffered horseradish-peroxidase (HRP) conjugated rabbit anti-human IgG with added Thimerosal and surfactant. **Do not dilute, ready for use.**

*Volume:* 13.0 ml Ref CEEPP00  
**Enzyme ConjugateGM** – Vial containing buffered horseradish-peroxidase (HRP) conjugated rabbit anti-human IgG and Ig M with added Thimerosal and surfactant. **Do not dilute, ready for use.**

*Volume:* 2.0 ml Ref CEEPPGM00  
**Sample Diluent** – Bottle containing buffered solution to dilute patient samples. Contains BSA 0.25 % and Thimerosal 0.01 %.

*Volum :* 50 ml Ref DCE00  
**Enzyme Substrate** – Vial containing buffered tetramethylbenzidine (TMB) with 0.03% hydrogen-peroxide. **Attention – Protect from light.**

*Volume:* 13 ml Ref CS00  
**Stop Solution** – Vial containing 0.3M sulphuric acid.

*Caution:* irritant, handle with care.

*Volume:* 13 ml Ref SS00

**Adhesive Cover - Quantity:** 2

**Product Insert** Ref INSLPU4000

**Glossary of Symbols** Ref SIM00

**Note – All human derived materials contained in this kit were tested and found negative for HbsAg, HIV1&2 and HCV antibodies.**

#### PREPARATION OF REAGENTS

**Wash Solution** – Dilute contents 1:10 with distilled or deionized water and mix well before use.

#### Conservation and Stability of Reagents

- Contents of the kit must be stored at 2 - 8°C and used prior to the expiry date printed on the labels.
- The alufoil pouch containing the microwell strips and dessicant should be kept sealed at all times and opened only to remove rapidly the required microwells for the number of determination to be performed. Once opened, correctly stored microwells are stable up to one month.
- Diluted Wash Solution can be stored up to two weeks at ambient temperature.

#### Materials necessary but not provided

- Deionised or distilled water
- Clean test tubes for diluted samples
- Precision pipettes with disposable tips for delivering 10, 100, 200 and 1000 µl
- Timing device
- Absorbent paper
- Automated or manual washing device capable of aspiration and delivering volumes of 300 - 400 µl.
- Microplate/strip reader with 450/630nm filter settings

#### Safety Precautions

- All reagents contained in the kit are for in vitro diagnostic use.
- At all times follow Good Laboratory Practice (GLP) guidelines.
- Handle all test specimens with utmost care to avoid infection with potentially hazardous fluids. Avoid skin contact by wearing protective disposable gloves.
- Sodium Azide (NaN<sub>3</sub>) contained in some of the kit reagents may react with lead or copper plumbing and form highly explosive metal azides. When disposing reagents flush with large amounts of water to avoid a build-up.

#### Technical Precautions

Precisely follow instructions described in the test procedure below.

- Prior to their use, let all reagents equilibrate 60 minutes at ambient temperature.
- Do not use reagents beyond the expiry date printed on each component label and do not mix reagents from different kit lots.
- Rapidly remove the needed micro wells and return remainder into the alufoil pouch with desiccant and store at 2 – 8 °C in refrigerator.
- Avoid interruption(s) in test procedure and follow same rate and sequence when pipeting reagents into microwells.
- It's advisable to cover the plate with the adhesive film supplied in the kit, during the incubations.
- Avoid all cross-contamination of reagents by using disposable pipet tips. Pipet fluids carefully into the bottom of tubes and microwells avoiding splashing of fluids or touching walls.
- Prevent any contact of the Chromogen/Substrate with oxidizing agents and metals and protect microwells from light during incubation.

#### Wash Instructions\*

Proper washing of the microwells is critical to assure accurate test results. The use of a correctly maintained and adjusted automated microplate wash device is recommended. In an automated or a manual mode, four (4) wash cycles of 400 µl/microwell and 30 second intervals before aspiration of wash buffer is required to avoid high backgrounds and/or false positive results.

#### Sample Preparation

Dilute patient sample(s) **1:101** with provided Sample Diluent and mix well. **Note – Do not dilute Controls provided in the kit.**

#### TEST PROCEDURE at ambient temperature (18-30°C).

*Note – Prior to their use, let all needed reagents equilibrate 60 minutes at ambient temperature.*

1. **Pipette 100 µl of Positive or Negative Control into the first microwell, and 100 µl of the appropriately diluted test samples into the remaining microwells.**
2. **Incubate microwells 30 minutes (±5 min) at ambient temperature.**

REF	Rev	Dat.	Pag.
INSLPU40	00	19/03/04	5/7

3. Wash all microwells following wash instructions described above. \*
4. Pipette 100 µl of HRP anti Ig G Conjugate into the first seven microwells and 100 µl of HRP anti Ig G/Ig M Conjugate in the eighth microwell.
5. Incubate microwells 30 minutes (±5 min) at ambient temperature.
6. Wash all microwells following wash instructions described above. \*
7. Pipette 100 µl of TMB Substrate into all microwells and incubate 10 minutes (±1 min) at ambient temperature in the dark.
8. Pipette 100 µl of Stop Solution into each microwell and read optical density (OD) at 450/630nm on a microplate/strip reader.

Note – Read microwells within 30 minutes following the addition of the Stop Solution.

#### Quality Control

Results are considered valid if:

- The mean OD of the Negative Control must be <0.250. Any higher OD may indicate a contamination of the Substrate, or insufficient washing of microwells between procedural steps.
- The mean OD of the Positive Control must be >1.500. Lower OD may indicate improper storage or contamination and procedural errors.

If the test series is considered invalid recheck reagent preparation and assay procedure, storage condition and expiry date of reagents before repeating assay.

#### INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with ≤0.400 OD are considered negative.

Samples with OD's between 0.400 and 0.600 are considered border line.

Samples with ≥0.600 OD are considered positive.

Note: All border line samples should be repeated with a confirmatory test.

#### Example:

Negative Control (OD's):	0.100, 0.110, 0.090
Mean value:	0.100
Positive Control:	2.100
Sample #1	0.235 negative
Sample #2	1.050 positive
Sample #3	0.555 border line

#### ASSAY PERFORMANCE

**Sensitivity** – Assay sensitivity was calculated based on results obtained with serially-diluted anti-ENA positive reference sera from commercial sources (Immunovision, The Binding Site, Intergen Biodiagnostics, Biomedical Resources, Serologicals). Dilutions were prepared as per supplier instructions.

**Specificity** – Samples from a group of healthy blood donors showed a relative specificity of >95%.

**Reproducibility** – A series of negative, border line positive and strong positive samples were repeatedly tested and CV's <10% were obtained.

#### LIMITATION OF PROCEDURE

The ASTRA IDENTI-ENA PLUS kit is a qualitative assay and should be used for the rapid discrimination between clearly negative and/or positive patient reactions only. Equivalent test reactions need to be repeated with a semi-quantitative method. Such results should be compared to a calibration curve or cut-off control. Test results obtained by this assay alone should not be considered diagnostic in isolation and they should only be considered in conjunction with the clinical presentation of the patient.

#### BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Lerner EA, Lerner MR, Hardin JA, Janeway CA, and Steitz JA, 1982. Deciphering the mysteries of RNA-containing lupus antigens. *Arth.Rheum.*25:761-766.
2. Notman DD, Kurata N, and Tan EM, 1975. Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Annals Intern. Med.*83:464-469.
3. Williams DG, Charles PJ, and Maini RN,1988.Preparative isolation of p67,A,B,B',and D from RNP/Sm and Sm antigens by reverse phase chromatography. Use in polypeptide specific ELISA for independent quantitation of anti-nRNP and anti-Sm antibodies. *J. Imm. Methods* 113:25-35.
4. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P,Brennan DM,and Hough D,1985.Antibodies to nRNP, Sm, Ro (SS-A) and La(SS-B) detected by ELISA: their specificity and interrelations in connective tissue disease sera. *Clin.Exp.Immunol.*62:337-345.
5. Combe B, Rucheton M, Graafland H, Lussiez V, Brunel C, and Sany J,1989.Clinical significance of anti-RNP and anti-Sm autoantibodies as determined by immunoblotting and immunoprecipitation in sera from patients with connective tissue diseases. *Clin.Exp.Immunol.*75:18-24.
6. Mattioli M, and Reichlin M, 1973. Physical association of two nuclear antigens and mutual occurrence of their antibodies: The relationship of the Sm and RNA protein (Mo) systems in SLE sera. *J.Immunol.*110 (5):1318-1324.
7. Takano M, Golden SS, Sharp GC, and Agris PF, 1981. Molecular relationships between two nuclear antigens, ribonucleoprotein and Sm: Purification of active antigens and their biochemical characterization. *Biochem.*20 (21):5929-5935.
8. Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR,1972. Mixed connective tissue disease-an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am.J.Med.*52:148-159.
9. Sharp GC,1982.Anti-RNP and anti-Sm antibodies. *Arthrit.Rheum.*25(7):757-760.
10. Collins RJ, Neil JC, Druery LN, and Wilson RJ,1989. Detection of antibodies to extractable nuclear antigens using calf thymus and rabbit thymus.*J.Imm.Methods* 116:53-57.

REF	Rev	Dat.	Pag.
INSLPU40	00	19/03/04	6/7

11. Tsay GJ, Chan EKL, Peebles CL, Pollard KM, and Tan EM, 1987. An immunoassay differentiating sera with antibodies to Sm alone, antibodies to Sm/RNP complex, and antibodies to RNP alone. *Arthr. Rheum.* 30(4):389-396.



**Astra s.r.l.**

Via Ciro Menotti 1/A  
I-20129 Milano  
[www.astradiagnostici.com](http://www.astradiagnostici.com)  
e-mail [info@astra-srl.it](mailto:info@astra-srl.it)

ISO 9001:2000 Certification IQNET IT-1730.

REF	Rev	Dat.	Pag.
INSLPU40	00	19/03/04	7/7