



AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUBLOTS[®]
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKUBLOTS[®] ANA-12 Pro

Ref 4000



Product Ref.	4000
Product Desc.	ANA-12 Pro
Manual Rev. No.	006 : 2016-11-07

Istruzioni per l'uso

Indice dei contenuti

1	Usò previsto.....	1
2	Applicazione clinica e principio del test.....	1
3	Contenuto del kit.....	2
4	Conservazione e stabilità.....	2
5	Precauzioni per l'uso e considerazioni generali.....	3
6	Raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni	4
7	Procedura del test.....	4
8	Interpretazione qualitativa	7
9	Dati tecnici	7
10	Performance del test.....	8
11	Bibliografia	8



1 Uso previsto

AESKUBLOTS® ANA-12 Pro è un test immunoenzimatico su membrana per la rilevazione qualitativa di anticorpi IgG diretti contro nucleosomi, dsDNA, istoni, Smd1, U1-snRNP, SS-A/Ro60kD, SS-A/Ro52kD, SS-B/La, SCL-70, CENP-B, Jo-1 e contro la proteina P-ribosomiale (Rib-P0) nel siero umano. Gli antigeni sono fissati secondo linee parallele in posizioni ben definite su una membrana di nitrocellulosa.

Il test è uno strumento per la diagnosi differenziale di malattie reumatiche sistemiche.

2 Applicazione clinica e principio del test

Gli anticorpi antinucleari (ANA) sono uno strumento rilevante per la diagnosi differenziale delle malattie reumatiche sistemiche. Il test di immunofluorescenza indiretta (IFT) su cellule eucariotiche tipo HeLa rappresenta la metodica consolidata utilizzata per la rilevazione degli anticorpi ANA. Le specificità dei singoli anticorpi sono evidenziate da pattern di fluorescenza. Tuttavia, per identificare in modo semplice ed affidabile gli anticorpi ANA, è disponibile anche una metodologia di analisi più specifica con la tecnica LIA (test immunologico rapido a cut-off), la quale utilizza gli antigeni target. Gli anticorpi ANA si riscontrano particolarmente in forme attive e inattive di lupus eritematoso sistemico (LES), in malattie miste del tessuto connettivo (MCTD), nella sclerodermia, nella sindrome di Sjögren e nella polimiosite.

Anticorpi:

- i nucleosomi sono diretti contro epitopi del complesso dell'istone (nucleosoma). Inoltre, anticorpi anti-dsDNA e anti-istone possono riconoscere epitopi del nucleosoma. Rispetto agli anticorpi anti-dsDNA, gli anticorpi anti-nucleosoma sono più sensibili e possono fornire un'utile indicazione per la diagnosi del LES (Chabre et al. 1995; Bruns et al. 2000). Inoltre, essi hanno rilevanza patogenetica in presenza di nefrite lupica (Van Bruggen et al. 1996; Amoura et al. 1999).
- I dsDNA sono considerati anticorpi specifici del LES e sono stati riscontrati all'incirca nel 50-80 % dei soggetti.
- Gli istoni sono comuni nei soggetti affetti da LES. Possono tuttavia riscontrarsi anche in presenza di altre malattie del tessuto connettivo. Gli anticorpi diretti contro gli istoni, in assenza di altri auto-anticorpi (in particolare anti-dsDNA), sono un marker caratteristico del lupus eritematoso indotto da sostanze d'abuso (Rubin 1999).
- Gli Smd1 (antigene Smith) sono diretti contro la proteina vettrice D1 di piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNP). Sia gli anticorpi anti-Sm, sia quelli diretti contro il DNA a doppia elica (dsDNA) sono altamente specifici del LES e pertanto sono inclusi nei criteri diagnostici e di classificazione del LES.
- Gli U1-snRNP sono patognomoniche delle MCTD, ma si riscontrano anche in presenza del LES. Un alto titolo di anticorpi diretti contro questo antigene è caratteristico della sindrome di Sharp.
- Alti titoli di SS-A (Ro; ribonucleoproteine nucleari solubili e/o citoplasmatiche di 52 kDa e 60 kDa) e di anticorpi diretti contro SS-B (La; proteina di 48 kDa associata con RNA polimerasi III) si riscontrano principalmente nella sindrome primaria e secondaria di Sjögren, ma anche nel LES, nel blocco cardiaco congenito e nel lupus neonatale.
- Gli Scl-70 sono diretti contro le DNA topoisomerasi I. Sono altamente specifici della sclerodermia sistemica e sono indicativi di un decorso grave della malattia.
- I CENP-B (proteina B centromerica di 80 kDa) sono caratteristici della sindrome CREST (69 % dei soggetti affetti da CREST), che è una forma più avanzata di sclerosi sistemica.
- Gli Jo-1 sono diretti contro la istidil-tRNA-sintetasi (una proteina citoplasmatica che interviene nella biosintesi proteica) e si riscontrano nel 20-40 % dei soggetti affetti da polimiosite e dermatomiosite.
- Le proteine P-ribosomiali sono dirette contro diverse fosfoproteine della subunità ribosomiale maggiore. Si riscontrano in soggetti affetti da lupus eritematoso sistemico (Elkon et al. 1985) e in soggetti affetti da lupus con coinvolgimento cerebrale (Bonfa et al. 1987).

Principio del test

Gli antigeni sono fissati, in linee parallele, su una membrana di nitrocellulosa. La membrana è stabilizzata per evitare reazioni aspecifiche. Le strisce di membrana con gli specifici antigeni, fissati in posizioni ben definite, vengono incubate in campioni di siero diluiti con un rapporto di 1:101. Gli anticorpi del soggetto, se presenti nel campione, si legano con l'antigene. La frazione non legata viene eliminata tramite lavaggio nella fase seguente. Successivamente le immunoglobuline anti-umane, coniugate con perossidasi di rafano (coniugata), vengono incubate e reagiscono con il complesso anticorpo-antigene dei campioni. Il coniugato non legato viene eliminato tramite lavaggio nella fase seguente. L'aggiunta del substrato TMB provoca una reazione enzimatica che lo converte in un precipitato di colore blu. La reazione viene bloccata con acqua distillata.

3 Contenuto del kit

DA RICOSTITUIRE PRIMA DELL'USO				
Componente	Quantità	Colore del tappo	Colore della soluzione	Descrizione / Contenuto
Reagente bloccante	3 da 10 ml di concentrato ciascuno	bianco	Nds	Latte in polvere secco non-grasso per la preparazione di 3 tamponi campione da 10 ml
Tampone di lavaggio (20x)	1 x 50 ml	bianco	incolore	20 volte concentrato per la preparazione di 1 litro di tampone TRIS, pH 6,9 ± 0,2
PRONTO ALL'USO				
Componente	Quantità	Colore del tappo	Colore della soluzione	Descrizione / Contenuto
IgG, coniugato	1 x 10 ml	blu	incolore	Immunoglobulina G anti-umana (IgG) coniugata con perossidasi di rafano
Substrato TMB	1 x 10 ml	nero	incolore	TMB stabilizzato /H ₂ O ₂
Strip di membrana	24 strip	codice colore: giallo	Nds	Per gli antigeni rivestiti si rimanda all'Uso previsto
pinzette, modello di riferimento, tabella di valutazione, striscia adesiva (biadesiva, nera)	1 pezzo ciascuno	Nds	Nds	Nds
vaschetta d'incubazione	3 pezzi	Nds	Nds	Nds
Etichette per tampone campione	3 pezzi	Nds	Nds	Nds
MATERIALE OCCORRENTE, MA NON FORNITO NEL KIT				
piastra oscillante, bombola da 1000 ml, pipetta o bombola da 10 ml, pipette di precisione (10, 1000 µl), carta assorbente o filtrante. I nostri test sono concepiti per essere eseguiti con acqua depurata, conformemente alle disposizioni della Farmacopea degli Stati Uniti (USP 26 - NF 21) e della Farmacopea Europea (Eur.Ph. 4a ed.).				

4 Conservazione e stabilità

Conservare tutti i reagenti e le strip di membrana ad una temperatura di 2÷8 °C/35÷46°F nei rispettivi contenitori originali. Una volta preparate, le soluzioni ricostituite sono stabili a 2-8°C/35-46°F per almeno sei settimane. Reagenti e strip devono essere utilizzati entro la data

di scadenza indicata sulla confezione. Non utilizzare i componenti dopo la data di scadenza indicata. Evitare di esporre la soluzione TMB a fonti di luce intensa.

5 Precauzioni per l'uso e considerazioni generali

5.1 Dati sulla sicurezza

Questo prodotto è per esclusivo uso DIAGNOSTICO IN VITRO. Pertanto, il kit è destinato esclusivamente a personale di laboratorio altamente qualificato e specializzato in metodologie di diagnostica in vitro. Sebbene questo prodotto non sia considerato particolarmente tossico o pericoloso nelle normali condizioni d'uso previsto, occorre attenersi a quanto segue per operare in massima sicurezza:

Avvertenze e precauzioni

Questo kit contiene componenti potenzialmente pericolosi. Sebbene i reagenti contenuti nel kit non siano classificati come irritanti per gli occhi e la cute, si raccomanda di evitare qualsiasi contatto con occhi e cute e di indossare guanti monouso.

Il substrato contiene caton (1% v/v) come conservante. Non deve essere ingerito e non deve venire a contatto con la cute o le mucose.

Quando si utilizza il kit si raccomanda di non fumare, di non mangiare e di non bere. Non pipettare con la bocca.

Trattare i campioni clinici come potenzialmente infetti, quindi nel totale rispetto delle normative nazionali vigenti.

5.2 Indicazioni generali per l'uso

Un codice colore, posizionato sopra la linea di riferimento delle strip, contraddistingue i vari test **AESKUBLOTS®** disponibili:

Codice colore	AESKUBLOTS®
giallo	ANA-12 Pro
arancione	ANA-17 Pro
blu	Myositis Pro
marrone	Liver Pro
porpora	Vasculitis Pro
nero	Gastro Pro
verde	Borrelia-G e Borrelia-M

Se le informazioni contenute sul prodotto, etichette incluse, risultassero inesatte, contattare il produttore o il fornitore del kit.

Il reagente bloccante e il tampone di lavaggio sono interscambiabili tra lotti di kit differenti. Tutti gli altri componenti si intendono specifici di ogni singolo kit e pertanto non sono interscambiabili. Non si devono scambiare le componenti tra test di autoimmunità e diagnostica per Borrelia.

Per manipolare il coniugato non utilizzare recipienti in polistirene.

Prima dell'uso portare tutti i componenti a temperatura ambiente (20-32°C/68-89,6°F), miscelare bene e seguire lo schema di incubazione prescritto per una performance ottimale del test.

Non esporre mai i componenti ad una temperatura superiore a 37°C/ 98,6°F.

Pipettare la soluzione del substrato sempre ed esclusivamente con puntali nuovi. Proteggere questo reagente da fonti luminose. Non pipettare mai il coniugato con puntali utilizzati precedentemente per altri reagenti.

L'intensità del colore di banda non è necessariamente correlata ai titoli di un anticorpo rilevati con altre metodologie di riferimento.

Campioni provenienti da donatori di sangue apparentemente sani possono contenere autoanticorpi.

Se il campione clinico contiene livelli elevati di complessi immuni o di altri aggregati di immunoglobuline, non sarà possibile escludere risultati falso positivi per mezzo di un legante non-specifico.

Una diagnosi clinica definitiva non dovrebbe basarsi esclusivamente sui risultati del test condotto, che dovrebbe essere richiesto dal medico solo dopo aver valutato tutte le analisi cliniche e di laboratorio. La diagnosi deve essere verificata utilizzando metodologie diagnostiche differenti.

6 Raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni

Utilizzare preferibilmente campioni di siero freschi. Il prelievo di sangue deve essere effettuato secondo le normative nazionali vigenti. Non utilizzare campioni itterici, lipemici, emolizzati o contaminati da batteri. Sieri contenenti particelle devono essere separati, utilizzando una centrifuga a bassa velocità (<1000 giri). I campioni di sangue devono essere raccolti in provette pulite, asciutte e vuote.

Dopo la separazione, i campioni di siero devono essere utilizzati entro le 8 ore successive. In caso contrario, possono essere conservati in flaconi a chiusura ermetica a 2-8°C/35-46°F per un massimo di 48 ore, oppure congelati a -20°C/-4°F per periodi più lunghi. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Non utilizzare campioni riscaldati perciò inattivati.

7 Procedura del test

7.1 Preparazione preliminare

Verificare che non si siano formati cristalli di sale nel concentrato. In caso contrario occorre sciogliere i cristalli scaldando leggermente il concentrato (la temperatura ambiente dovrebbe essere sufficiente).

Diluire il tampone di lavaggio concentrato a 1:20 con acqua distillata (ad es. 950 ml + 50 ml).

Per la preparazione del tampone campione: aggiungere 10 ml del tampone di lavaggio ad un flacone di Reagente bloccante e miscelare bene.

7.2 Fasi del test

Indicazioni importanti:

Seguire esattamente questo protocollo. Assicurarsi che i due componenti citati nel protocollo vengono aggiunti al vassoio in fasi 2, 6, 9.

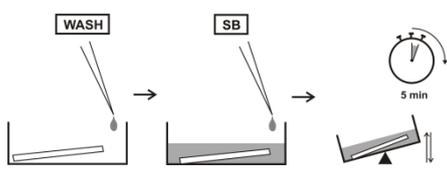
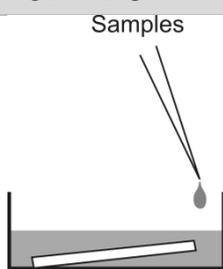
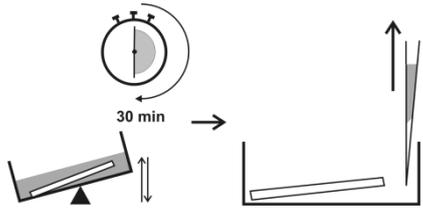
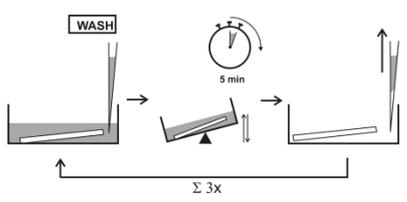
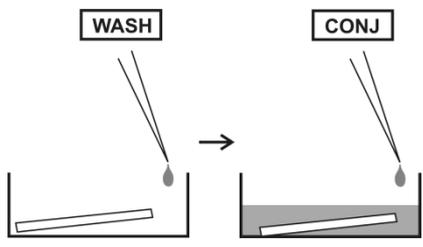
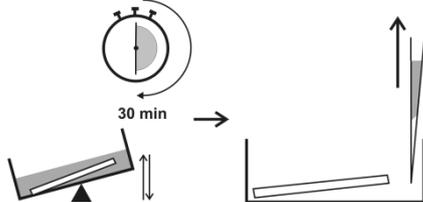
Evitare che la strip si asciughi durante le fasi di incubazione.

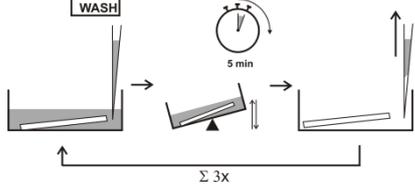
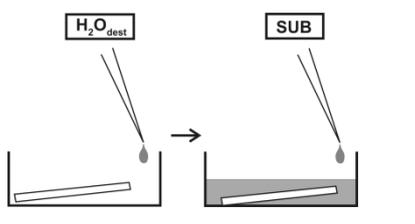
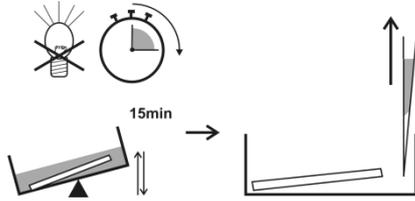
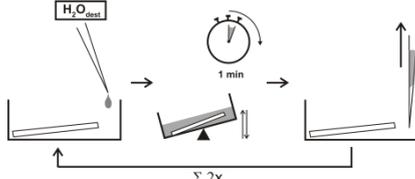
Non afferrare la strip con le dita, utilizzare le pinzette.

Rimuovere i campioni diluiti subito dopo l'incubazione, per evitare il prolungarsi dell'azione.

Agitare costantemente la strip durante le fasi di incubazione.

Collocare il tampone campione, il coniugato e il substrato unitamente con il tampone di lavaggio su un lato della vaschetta d'incubazione. Non contaminare la striscia.

Fase	Descrizione
1.	Prima di iniziare il test assicurarsi che le preparazioni, dalla fase 7.1 descritta sopra, siano state eseguite.
2.	 <p>Posizionare correttamente la strip nella vaschetta d'incubazione (linea di riferimento e codice colore rivolti verso l'alto). Dispensare 700 µl di tampone di lavaggio e 300 µl di tampone campione nella vaschetta d'incubazione. Inumidire la strip con la soluzione e incubare per 5 minuti agitando bene.</p>
CONTROLLI E CAMPIONI	
3.	 <p>Pipettare 10 µl di campione di siero nei pozzetti predisposti della vaschetta d'incubazione con il tampone campione.</p>
4.	 <p>Incubare per 30 minuti a 20-32°C/68-89,6°F, agitando bene. Dopodiché rimuovere completamente il campione.</p>
5.	 <p>Lavare 3 volte per 5 minuti con 1,5 ml di tampone di lavaggio, agitando bene. Rimuovere il tampone di lavaggio dopo ogni fase di lavaggio.</p>
CONIUGATO	
6.	 <p>Pipettare 700 µl di tampone di lavaggio e 300 µl di coniugato in ogni vaschetta d'incubazione con la strip.</p>
7.	 <p>Incubare per 30 minuti a 20-32°C/68-89,6°F, agitando bene. Rimuovere il coniugato.</p>

8.		<p>Lavare 3 volte per 5 minuti con 1,5 ml di tampone di lavaggio, agitando bene. Rimuovere il tampone di lavaggio dopo ogni fase di lavaggio.</p>
SUBSTRATO		
9.		<p>Pipettare 700 µl di dH₂O e 300 µl di substrato in ogni vaschetta d'incubazione con la strip.</p>
10.		<p>Incubare per 15 minuti a 20-32°C/68-89,6°F, agitando bene, al riparo da fonti luminose intense. Rimuovere il substrato.</p>
STOP		
11.		<p>Pipettare 2 ml di dH₂O in ogni vaschetta d'incubazione con la strip. Incubare per 1 minuto, agitando bene. Rimuovere dH₂O. Replicare una volta.</p>
12.	<p>Rimuovere la strip dalla vaschetta d'incubazione. Asciugare la strip con carta assorbente</p>	
13.	<p>Analizzare i risultati entro 24 ore.</p>	

8 Interpretazione qualitativa

8.1 Analisi manuale

I risultati del test possono considerarsi validi se:

- è visibile un controllo funzionale
- è visibile un controllo cut-off
- l'intensità del colore del controllo cut-off è più debole di quella del controllo funzionale

Incollare la strip asciutta sulla tabella di valutazione, allineandola alla linea di riferimento. Allineare il modello di riferimento alla linea di riferimento della strip. Interpretare i risultati facendo riferimento esclusivamente al controllo cut-off di ciascuna strip.

Ogni kit contiene una copia colore di tutte le bande disponibili nel test.

L'analisi viene effettuata comparando l'intensità di colore delle bande con l'intensità di colore del controllo cut-off. Il test è dubbio se le intensità di colore non si discostano in modo significativo l'una dall'altra. Se il colore è più intenso il risultato del test è positivo, se l'intensità del colore è più debole il test è negativo.

I risultati possono essere registrati sulla tabella di valutazione.

Nel caso in cui i valori dei controlli non corrispondano ai criteri stabiliti il test non è valido e deve essere ripetuto. Si raccomanda di ritestare i campioni borderline.

Verificare inoltre le seguenti problematiche tecniche: data di scadenza dei reagenti (preparati), condizioni di conservazione, pipette, attrezzatura, condizioni di incubazione e metodi di lavaggio.

Se i campioni testati evidenziano valori aberranti o anomalie di qualsiasi tipo, oppure i criteri di validazione non vengono raggiunti per ragioni non imputabili alla responsabilità dell'operatore, contattare il produttore o il fornitore del kit di test.

I laboratori medici possono eseguire un controllo qualità interno, utilizzando metodologie proprie e/o sieri coltivati internamente, secondo quanto stabilito dalle normative nazionali vigenti.

9 Dati tecnici

Materiale del campione:	siero
Volume del campione:	10 µl di campione
Tempo di incubazione complessivo:	112 minuti a 20-32°C/68-89,6°F
Conservazione:	a 2-8°C/35-46°F; utilizzare esclusivamente flaconi originali.
Numero di determinazioni:	24 test

10 Performance del test

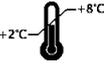
10.1 Sensibilità e specificità relativa

Per la determinazione della concordanza positiva (sensibilità relativa) sono stati esaminati con **AESKUBLOTS® ANA-12 Pro** 85 sieri di pazienti testati positivamente con IIF. Per la determinazione della concordanza negativa (specificità relativa) sono stati analizzati 100 sieri di donatori di sangue.

	concordanza negativa (specificità relativa)		concordanza positiva (sensibilità relativa)	
	in %	absolut	in %	absolut
nucleosomi	100 %	100/100	100 %	10/10
dsDNA	100 %	100/100	100 %	12/12
istoni	100 %	100/100	94 %	17/18
SmD1	100 %	100/100	100 %	15/15
U1-snRNP	98 %	98/100	100 %	16/16
SS-A/Ro60kD	100 %	100/100	100 %	28/28
SS-A/Ro52kD	100 %	100/100	100 %	23/23
SS-B/La	100 %	100/100	100 %	14/14
Scl-70	100 %	100/100	100 %	12/12
CENP-B	100 %	100/100	100 %	20/20
Jo-1	100 %	100/100	100 %	10/10
Rib-P0	100 %	100/100	100 %	7/7

11 Bibliografia

- Amoura Z, Piette J-C, Bach J-F, Koutouzov S (1995).** The key role of nucleosomes in lupus. *Arthritis & Rheumatism*. 42 (5):833–843.
- Bonfa E, Golombek SJ, Kaufman LD, Skelly S (1987).** Association between Lupus Psychosis and Antiribosomal P Protein Antibodies. *The New England Journal of Medicine*, 317(5):265-271.
- Bruns A, Bläss S, Hausdorf G, Burmester GR, Hiepe F (2000).** Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*. 43 (10):2307–2315.
- Chabre H, Amoura Z, Piette J-C, Godeau P, Bach J-F, Koutouzov S (1995).** Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*. 38 (10):1485–1491.
- Elkon KB, AP, Foster CL (1985).** Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J Exp Med*. 162(2):459–71
- Rubin RL (1999).** Etiology and mechanism of drug-induced lupus. *Curr Opin Rheumatol* 11:357–365.
- Van Bruggen MC, Kramers C, Berden JH (1996).** Autoimmunity against nucleosomes and lupus nephritis. *Ann Med Interne*. 147(7):485–9.
- Per maggiori informazioni:**
- Peter JB, Shoenfeld Y (1996).** Autoantibodies. Elsevier Sciences B.V., Amsterdam.
- Tan EM, (1989).** Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol* 44: 93–151.

IVD	Diagnosi in vitro	For in vitro diagnostic use
	Pour diagnostic in vitro	Para uso diagnóstico in vitro
	In Vitro Diagnostikum	In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	Numero d'ordine	Catalogue number
	Référence Catalogue	Numéro de catálogo
	Bestellnummer	Αριθμός παραγγελίας
	Número de catálogo	
LOT	Descrizione lotto	Lot
	Lot	Lote
	Chargen Bezeichnung	Χαρακτηρισμός παρτίδας
	Lote	
CE	Conformità europea	EC Declaration of Conformity
	Déclaration CE de Conformité	Declaración CE de Conformidad
	Europäische Konformität	Ευρωπαϊκή συμφωνία
	Déclaracão CE de Conformidade	
	24 determinazioni	24 tests
	24 tests	24 pruebas
	24 Bestimmungen	24 προσδιορισμοί
	24 Testes	
	Rispettare le istruzioni per l'uso	See instructions for use
	Voir les instructions d'utilisation	Ver las instrucciones de uso
	Gebrauchsanweisung beachten	Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	Ver as instruções de uso	
	Da utilizzarsi entro	Use by
	Utilise avant le	Utilizar antes de
	Verwendbar bis	Χρήση μέχρι
	Utilizar antes de	
	Conservare a 2-8°C	Store at 2-8°C (35-46°F)
	Conserver à 2-8°C	Conservar a 2-8°C
	Lagerung bei 2-8°C	Φυλάσσεται στους 2-8°C
	Conservar entre 2-8°C	
	Prodotto da	Manufactured by
	Fabriqué par	Fabricado por
	Hergestellt von	Κατασκευάζεται από
	Fabricado por	
STRIP	Strip di nitrocellulosa rivestita	Coated nitrocellulose strip
	Strip de nitrocellulose couché	Tira de nitrocellulosa recubierta
	Nitrozellulosemembran-Streifen mit aufgebracht Antigenen	Επίστρωση λωρίδα νιτροκυτταρίνης
	Tira de nitrocellulose revestido	
WASH 20x	Tampone di lavaggio	Wash buffer
	Tampon de Lavage	Solución de lavado
	Waschpuffer	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	Solução de lavagem	
Block-Reag	Reagente bloccante	Blocking Reagent
	réactif de blocage	Reactivo bloqueante
	Blockier-Reagenz	Αντιδραστήριο αποκλεισμού
	Bloqueio de reagente	
RCNS 10ml	Ricostituire con 10 mL	Reconstitute with 10 mL
	reconstituer avec 10 mL	reconstituir con 10 mL
	rekonstituieren mit 10 mL	Ανασύσταση με 10 mL
	reconstituir com 10 mL	
SB	Tampone campione	Sample buffer
	Tampon Echantillons	Tampón Muestras
	Probenpuffer	Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	Diluente de amostra	
CONJ	Coniugato	Conjugate
	Conjugé	Conjugado
	Konjugat	Σύζευγμα
	Conjugado	
SUB	Tampone substrato	Substrate buffer
	Substrat	Tampón sustrato
	Substratpuffer	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	Substrato	

