



DCM119-1
Ed. 01/2015

ENA Profile

per analisi di routine

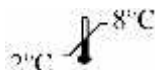
Determinazione immunoenzimatica indiretta degli autoantibody di classe IgG diretti contro gli ENA (Antigeni Nucleari Estraibili) in siero o plasma umano.

IVD



LOT

Vedi etichetta sterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO119

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Diametra ENA Profile è un dosaggio immunoenzimatico (ELISA) indiretto in fase solida per la misurazione qualitativa degli autoanticorpi di classe IgG diretti contro antigeni nucleari estraibili in siero o plasma umano. Il test è stato progettato per solo uso diagnostico in vitro come ausilio nella diagnosi di malattie del tessuto connettivo.

Il kit Diametra ENA Profile è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Gli anticorpi anti antigeni nucleari estraibili sono caratteristici per alcune malattie reumatiche e possono contribuire alla diagnosi e prognosi del "lupus eritematoso sistemico" (LES), della sindrome di Sjögren, della malattia mista del tessuto connettivo (MCTD), della sclerodermia, della poli- e dermatomiosite e della sindrome CREST.

Diametra ENA Profile consente la rilevazione simultanea degli autoanticorpi specifici per SS-A/Ro, SS-B/La, SMD1, U1-snRNP, Scl70, Jo1, Histone e Centromero B.

Antigene **SS-A / Ro**: SS-A 60 kDa, sindrome di Sjögren SS-A 52 kDa (~ 90%), LES (50%)

Antigene **SS-B / La**: SS-B sindrome di Sjögren (85%)

Antigene **SMD1**: SMD1 peptide SLE (70%)

Antigene **U1-snRNP**: RNP A, RNP-C, RNP 68kD malattia mista del tessuto connettivo (100%)

Antigene **Scl70**: Topoisomerasi I Sclerosi Sistemica (70%)

Antigene **Jo1**: istidil-tRNA-sintetasi polimiosite / dermatomiosite (25-30%)

Antigene **Histone**: Histone 2A, 2B, 3, 4 farmaco-indotta SLE (95%), LES (20-50%)

Antigene **Centromero B**: proteina B associata al Centromero (80kD) sindrome di CREST (calcinosi, fenomeno di Raynaud, disturbi della motilità esofagea, Sclerodattilia e Telangiectasia)

2. PRINCIPIO

Il test si basa sull'immobilizzazione per assorbimento degli antigeni nucleari estraibili (nativo, ricombinante e peptidici) alla micropiastre e successivo legame degli anticorpi ENA. Gli anticorpi legati vengono rilevati con un anticorpo secondario marcato con

perossidasi e diretto contro le IgG umane. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato, appare una colorazione la cui intensità è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi rilevati. Dopo l'aggiunta della soluzione di stop, il colore vira dal blu al giallo.

3. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibrator Control (1 flacone, 3 mL)

REF DCE002/11906-0

2. Negative Control (1 flacone, 3 mL)

Basato su siero umano

REF DCE045/11901-0

3. Conjugate (1 flacone, 15 mL)

Anticorpo anti IgG umane coniugato a perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/11902-0

4. Coated Microplate (1 micropiastre breakable)

Antigeni coattati: SS-A/Ro (strip A1-12), SS-B/La (B1-12), SmD1 (C1-12), U1-snRNP (D1-12), Histone (E1-12), CENP-B (F1-12), Scl70 (G1-12) and Jo-1 (H1-12)

REF DCE002/11903-0

5. Sample diluent (1 flacone, 100 mL)

Tampone fosfato

REF DCE053/11953-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂ 3 mM, TMB 1.2 mM (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004/11904-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Acido solforico 0.5M (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005/11905-0

8. 20X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Tampone Tris

REF DCE007/11907-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliari

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-690 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a $2\div 8^{\circ}\text{C}$, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reattivi devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN_3) o di MIT (2-Methyl-4-isothiazolin-3-on) come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente $\text{TMB}/\text{H}_2\text{O}_2$ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di $2\div 8^{\circ}\text{C}$ nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.

- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente ($22\div 28^{\circ}\text{C}$) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDURA

6.1. Preparazione del campione

Il dosaggio ENA Profile può essere usato su siero o plasma umano.

Utilizzare campioni freschi o congelati a -20°C .

Congelare e scongelare 1 volta sola. Non utilizzare campioni inattivati al calore a 56°C . Prima del dosaggio portare il campione a temperatura ambiente per circa 30 minuti.

Diluire i campioni 1:101 con il Sample diluent (reagent 5) (per esempio aggiungere 10 μL di campione a 1 mL di sample diluent).

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "20X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:20. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a $2\div 8^{\circ}\text{C}$ per almeno 30 giorni.

6.3. Procedura

- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C).
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali

1. Pipettare 8 volte 100 µL di siero diluito di paziente, di Controllo Negativo (NC) e di Calibrator Control (CAL) nella micropiastre secondo il seguente schema:

	1	2	3	...	12	antigen
A	NC	CAL	paziente 1	...	paziente 10	SS-A/Ro
B	NC	CAL	paziente 1	...	paziente 10	SS-B/La
C	NC	CAL	paziente 1	...	paziente 10	SmD1
D	NC	CAL	paziente 1	...	paziente 10	U1-snRNP
E	NC	CAL	paziente 1	...	paziente 10	Histone
F	NC	CAL	paziente 1	...	paziente 10	CENP-B
G	NC	CAL	paziente 1	...	paziente 10	Scl70
H	NC	CAL	paziente 1	...	paziente 10	Jo-1

2. Sigillare la micropiastre con la strip adesiva e incubare 1h a temperatura ambiente (22-28°C).
3. Rimuovere la soluzione. Lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.
4. Pipettare 100 µL di Conjugate e sigillare la micropiastre con la strip adesiva.
5. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C).
6. Rimuovere la soluzione. Lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.
7. Pipettare 100 µL di TMB Substrate e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (22-28°C).
8. Aggiungere 100 µL di Stop Solution.
9. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm entro 10 minuti. Si raccomanda una misura bicromatica con una lunghezza d'onda di riferimento di 620-690 nm.

7. CONTROLLO QUALITA'

7.1. Validazione del test

I risultati del test sono validi a condizione che i seguenti criteri siano rispettati:

- Il Calibrator Control non scenda sotto un valore di assorbanza di 0,3.
- Il Calibrator Control non superi un valore di assorbanza di 3,2
- Opzionale: [CAL] > [NC]

8. RISULTATI

8.1. Interpretazione dei risultati

L'interpretazione dei risultati può essere effettuata confrontando le assorbanze ricalcolate del Calibrator Control (CAL) e dei campioni.

Per ciascun antigene, l'assorbanza di Cut-Off deve essere calcolata secondo la seguente equazione:

OD_{Cut-Off} = OD [CAL] x fattore specifico (vedi certificato di analisi)

- Assorbanze > 1,1 x OD_{Cut-Off} devono essere considerate **positive**.
- Assorbanze < 0,9 x OD_{Cut-Off} devono essere considerate **negative**.
- Assorbanze tra 0,9 x OD_{Cut-Off} e 1,1 x OD_{Cut-Off} devono essere considerate come **dubbie**.

Esempio di calcolo:

Riga	Antigene	OD CAL	Fattore	OD Cut-off	OD Sample	Risultato
A	SS-A/Ro	1.393	0.21	0.293	1.379	Pos
B	SS-B/La	0.562	0.55	0.309	2.442	Pos
C	SmD1	0.843	0.58	0.489	0.056	Neg
D	U1-snRNP	1.069	0.33	0.353	0.060	Neg
E	Histone	1.009	0.38	0.383	0.100	Neg
F	CENP-B	1.089	0.30	0.327	0.044	Neg
G	Scl70	1.025	0.44	0.451	0.096	Neg
H	Jo-1	0.870	0.43	0.374	0.055	Neg

9. LIMITAZIONI

Un risultato positivo deve essere interpretato in associazione con la valutazione clinica e le procedure diagnostiche. I valori ottenuti da questo test sono destinate ad essere un aiuto per la diagnosi. Elevati valori di anticorpi antinucleari possono verificarsi in soggetti senza evidenza clinica di malattia. Se il paziente presenta livelli elevati di complessi immuni o di altri aggregati di immunoglobuline non si può escludere risultati falsi positivi dovuti al legame non specifico.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Sensibilità e Specificità Diagnostica

133 campioni provenienti da pazienti con positività anticorpale sono stati testati per studiare la sensibilità diagnostica del kit Diametra ENA Profile. La specificità diagnostica è stata determinata utilizzando 100 campioni di siero di donatori di sangue apparentemente sani:

		Positive	Negative
Cumulative results	Pos	130	3
	Neg	3*	97
SS-A/Ro	Pos	45	0
	Neg	88	100
SS-B/La	Pos	24	0
	Neg	109	100
SmD1	Pos	18	0
	Neg	115	100

U1-snRNP	Pos	18	1
	Neg	115	99
Histones	Pos	18	2
	Neg	115	98
CENP-B	Pos	26	0
	Neg	107	100
Scl70	Pos	13	0
	Neg	120	100
Jo-1	Pos	12	0
	Neg	121	100

*Dei 3 campioni discrepanti risultati negativi nell' ENA Profile, ma positive in ANA Screen, un campione è risultato positivo per gli anticorpi contro gli istoni, un campione è stato testato positivo per gli anticorpi contro SS-B/La e un campione era borderline per Scl-70 e ha mostrato in fluorescenza un maculato pattern nucleolare.

Conclusioni:

Sensibilità relativa	130/133	97.7%
Specificità relativa	97/100	97.0%
Corrispondenza relativa	227/233	97.4%

10.2. Sensibilità analitica (Limite di Detezione)

La sensibilità analitica (rapporto del cut-off) è stata determinata utilizzando il tampone di diluizione come bianco. La media assoluta è stata ottenuta da 12 determinazioni su due diversi lotti.

Il limite di rilevamento per ciascun specificità antigenica è stata calcolata dalla media assoluta più tre deviazioni standard (SD). Le sensibilità analitiche calcolate sono indicate nella tabella seguente.

Antigene	Media (OD 450nm)	SD (OD 450nm)	Sensibilità analitica (Rapporto C/O)
SS-A/Ro	0.010	0.002	0.073
SS-B/La	0.008	0.002	0.071
SmD1	0.010	0.002	0.051
U1-snRNP	0.012	0.002	0.085
Histones	0.010	0.003	0.095
CENP-B	0.010	0.003	0.084
Scl70	0.010	0.003	0.068
Jo-1	0.011	0.003	0.090

10.3. Interferenze

Le sostanze potenzialmente interferenti sono state valutate aggiungendo a tre campioni bassi positivi bilirubina in concentrazione 0,2 mg/mL, emoglobina a 400 mg/dL e lipidi a 15 mg/mL.

La seguente tabella elenca le sostanze testate nella loro concentrazione finale che è stata impostata su un livello superiore di concentrazione fisiologicamente rilevante.

Sostanza	Concentrazione
Bilirubina	0.2 mg/mL
Emoglobina	4.0 mg/mL
Lipidi	15 mg/mL

In generale non è stata osservata nessuna interferenza da una delle sostanze testate con controlli positivi e negativi fino alle concentrazioni indicate. Tuttavia, in caso di dosaggi in condizioni di forte emolisi (emoglobina > 4,0 mg/mL) o itterici (bilirubina > 0,2 mg / mL) o in presenza di campioni lipemici, dovrebbero essere prese in considerazione possibili interferenze che potrebbero condurre a risultati falsi.

10.4. Precisione

10.4.1. Intra-assay

Per la determinazione dell'intra-assay sono state effettuate 8 misurazioni nello stesso dosaggio su 3 diversi sieri.

Campioni altamente positivi			
Antigene	Media (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	1.414	0.053	3.8
SS-B/La	0.715	0.034	4.8
SmD1	0.802	0.023	2.8
U1-snRNP	1.075	0.049	4.6
Histones	1.123	0.025	2.3
CENP-B	1.163	0.047	4.0
Scl70	1.216	0.048	3.9
Jo-1	1.103	0.021	1.9

Campioni positivi			
Antigene	Media (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	1.079	0.027	2.5
SS-B/La	0.654	0.031	4.7
SmD1	0.546	0.019	3.4
U1-snRNP	0.890	0.036	4.1
Histones	0.765	0.037	4.8
CENP-B	0.793	0.022	2.8
Scl70	0.857	0.030	3.5
Jo-1	0.793	0.021	2.7

Campioni negativi			
Antigene	Media (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	0.263	0.009	3.4
SS-B/La	0.094	0.005	4.9
SmD1	0.107	0.006	6.0
U1-snRNP	0.171	0.008	4.9
Histones	0.151	0.006	4.1
CENP-B	0.150	0.006	4.2
Scl70	0.136	0.004	3.2
Jo-1	0.105	0.004	3.8

La variazione intra assay è 1.9 – 6.0%.

10.4.2. Inter-assay

Per la determinazione dell'inter-assay sono state effettuate 8 misurazioni di 6 diversi sieri in 3 diversi dosaggi.

Campioni altamente positivi			
Antigene	Media (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	1.269	0.06	4.9
SS-B/La	0.512	0.05	9.8
SmD1	0.703	0.03	4.0
U1-snRNP	0.930	0.04	4.6
Histones	0.897	0.02	2.2
CENP-B	0.927	0.05	5.5
Scl70	0.833	0.04	4.7
Jo-1	0.665	0.04	6.1

Campioni positivi			
Antigene	Media (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	0.837	0.05	5.8
SS-B/La	0.306	0.03	8.7
SmD1	0.414	0.01	3.4
U1-snRNP	0.573	0.07	11.9
Histones	0.583	0.01	2.6
CENP-B	0.553	0.04	6.3
Scl70	0.486	0.03	6.7
Jo-1	0.387	0.03	6.7

Campioni negativi			
Antigene	Media (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	0.248	0.01	5.8
SS-B/La	0.080	0.01	9.6
SmD1	0.099	0.01	5.2
U1-snRNP	0.162	0.02	13.4
Histones	0.148	0.01	5.4
CENP-B	0.139	0.01	9.5
Scl70	0.131	0.01	6.0
Jo-1	0.100	0.01	6.2

La variazione inter-assay è 2.2 – 13.4%.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Damoiseaux J.G., Tervaert J.W., Autoimmun Rev. 5, 10-17 (2006)
2. Egner W., J. Clin. Pathol. 53, 424-432 (2000)
3. Conrad K. *et al.*, Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases – A Diagnostic Reference; Pabst Science

Ed. 01/2015

DCM119-1

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM119-1
Ed. 01/2015

ENA Profile

for routine analysis

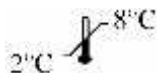
Indirect immunoenzymatic determination of IgG class autoantibodies against ENA (Extractable Nuclear Antigens) in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label



$\Sigma = 96$ test

REF DKO119

INTENDED USE

DiaMetra ENA Profile is an indirect solid-phase enzyme immunoassay (ELISA) for the qualitative measurement of IgG class autoantibodies against extractable nuclear antigens in human serum. The assay is intended for in vitro diagnostic use only as an aid in the diagnosis of connective tissue diseases. DiaMetra ENA Profile kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Antibodies to extractable nuclear antigens are characteristic for some rheumatic diseases and can contribute to the diagnosis and prognosis of systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome, mixed-connective tissue disease (MCTD), scleroderma, poly- and dermatomyositis and CREST syndrome.

The DiaMetra ENA Profile allows for the simultaneous detection of SS-A/Ro-, SS-B/La-, SmD1-, U1-snRNP-, Scl70-, Jo1-, Histone- and Centromere B-specific autoantibodies.

SS-A / Ro Antigen: SS-A 60, SS-A 52 Sjögren's syndrome (~90%), SLE (50%)

SS-B / La Antigen: SS-B Sjögren's syndrome (85%)

SmD1 Antigen: SmD1 peptide SLE (70%)

U1-snRNP Antigen: RNP-A, RNP-C, RNP 68kD Mixed Connective Tissue Disease (100%)

Scl70 Antigen: Topoisomerase I Systemic Sclerosis (70%)

Jo1 Antigen: Histidyl-tRNA-synthetase Polymyositis / Dermatomyositis (25-30%)

Histone Antigen: Histone 2A, 2B, 3, 4 Drug-induced SLE (95 %), SLE (20-50%)

Centromere B Antigen: Centromere-associated protein B (80kD) CREST syndrome (Calcinosis, Raynaud phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly and Telangiectasia)

2. PRINCIPLE

The test is based on the absorptive immobilisation of extractable nuclear antigens (native, recombinant and peptidic) to microtiter strips and subsequent binding of the ENA-antibodies. The bound antibodies are detected with a peroxidase-labelled secondary antibody that is directed against human IgG. After

addition of substrate solution, a colour appears which intensity is proportional to the concentration and/or the avidity of the detected antibodies. Following the addition of stop solution, the colour switches from blue to yellow.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

- Calibrator Control (1 vial, 3 mL)
REF DCE002/11906-0
- Negative Control (1 vial, 3 mL)
Human serum based
REF DCE045/11901-0
- Conjugate (1 vial, 15 mL)
Anti human IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP)
REF DCE002/11902-0
- Coated Microplate (1 breakable microplate)
Coated antigens: SS-A/Ro (strip A1-12), SS-B/La (B1-12), SmD1 (C1-12), U1-snRNP (D1-12), Histone (E1-12), CENP-B (F1-12), Scl70 (G1-12) and Jo-1 (H1-12)
REF DCE002/11903-0
- Sample diluent (1 vial, 100 mL)
Phosphate buffer
REF DCE053/11953-0
- TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
H₂O₂ 3 mM, TMB 1.2 mM (avoid any skin contact)
REF DCE004/11904-0
- Stop Solution (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.5M (avoid any skin contact)
REF DCE005/11905-0
- 20X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)
Tris buffer
REF DCE007/11907-0

3.2. Reagents necessary not supplied
Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation
Automatic dispenser.
Microplates reader (450 nm, 620-690 nm).

Note

Store all reagents at 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, the microplate is stable until the expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of standards for this product has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, Standards and Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of MIT (2-Methyl-4-isothiazolin-3-on) or Sodium Azide as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction for Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry dates printed on the labels of the box and of the vials must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user have the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.

- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated should not be used in the assay. Highly lipemic or haemolysed specimens should similarly not be used
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Sample

Diametra ENA Profile assay can be performed in human serum or plasma.

Use samples freshly collected or freeze samples at -20°C. **Freeze and thaw once only.** Do not use serum samples inactivated by heat treatment at 56°C. Allow the samples to reach room temperature (30 min.).

Dilute sera 1:101 with the Sample diluent (reagent 5) (for example add 10 µL of serum to 1 mL of sample diluent)

6.2. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of each vial of the buffered wash solution concentrate (20X) with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:20 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

6.3. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C).**
 - Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
 - To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
1. Pipette 8 times 100 µL of diluted patient serum, the Negative Control (NC) and the Calibrator Control (CAL) in the microplate according to the following recommended scheme:

	1	2	3	...	12	antigen
A	NC	CAL	patient 1	...	patient 10	SS-A/Ro
B	NC	CAL	patient 1	...	patient 10	SS-B/La
C	NC	CAL	patient 1	...	patient 10	SmD1
D	NC	CAL	patient 1	...	patient 10	U1-snRNP
E	NC	CAL	patient 1	...	patient 10	Histone
F	NC	CAL	patient 1	...	patient 10	CENP-B
G	NC	CAL	patient 1	...	patient 10	Scl70
H	NC	CAL	patient 1	...	patient 10	Jo-1

- Seal the microplate with adhesive strip and incubate for 1h at room temperature (22-28°C)
- Discard the solution. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.
- Pipette 100 µL of Conjugate and seal the microplate with adhesive strip.
- Incubate for 30 minutes at room temperature (22-28°C).
- Discard the solution. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.
- Pipette 100 µL of TMB Substrate and incubate for 10 minutes at room temperature (22-28°C).
- Add 100 µL of Stop Solution.
- Read the absorbance (E) at 450 nm within the next 10 minutes after stopping. Bi-chromatic measurement with a reference wavelength at 620-690 nm is recommended.

7. QUALITY CONTROL

7.1. Validation of the test

The test results are valid provided that the following criteria are met:

- The Calibrator Control does not fall below an absorbance value of 0.3.
- The Calibrator Control does not exceed an absorbance value of 3.2
- Optionally: [CAL] > [NC]

8. RESULTS

8.1. Interpretation of Results

Interpretation of results can be made by comparing the recalculated absorbances of the Calibrator Control (CAL) and of the samples.

For each antigen the Cut-Off absorbance should be calculated according to the following equation:

OD_{Cut-Off} = OD [CAL] x Specific Factor (see Certificate of analysis)

- Absorbances > 1.1 x OD_{Cut-Off} have to be considered as positive.
- Absorbances < 0.9 x OD_{Cut-Off} have to be considered as negative.
- Absorbances 0.9 x OD_{Cut-Off} and 1.1 x OD_{Cut-Off} have to be considered as equivocal.

Calculation Example:

Row	Antigen	OD CAL	Factor	OD Cut-off	OD Sample	Result
A	SS-A/Ro	1.393	0.21	0.293	1.379	Pos
B	SS-B/La	0.562	0.55	0.309	2.442	Pos
C	SmD1	0.843	0.58	0.489	0.056	Neg
D	U1-snRNP	1.069	0.33	0.353	0.060	Neg
E	Histone	1.009	0.38	0.383	0.100	Neg
F	CENP-B	1.089	0.30	0.327	0.044	Neg
G	Scl70	1.025	0.44	0.451	0.096	Neg
H	Jo-1	0.870	0.43	0.374	0.055	Neg

9. LIMITATIONS

A positive result must be used in association with clinical evaluation and diagnostic procedures. The values obtained from this assay are intended to be an aid for diagnosis only. Elevated antinuclear antibodies may occur in individuals with no evidence of clinical disease. If the patient sample contains elevated levels of immune complexes or other immunoglobulin aggregates, false positive results by non-specific binding cannot be ruled out.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Diagnostic Sensitivity and Diagnostic Specificity

133 samples from antibody positive patients were tested to study the diagnostic sensitivity of the Diametra ENA Profile. The diagnostic specificity was determined using 100 serum samples from apparently healthy blood donors:

		Positive	Negative
Cumulative results	Pos	130	3
	Neg	3*	97
SS-A/Ro	Pos	45	0
	Neg	88	100
SS-B/La	Pos	24	0
	Neg	109	100
SmD1	Pos	18	0
	Neg	115	100
U1-snRNP	Pos	18	1
	Neg	115	99
Histones	Pos	18	2
	Neg	115	98
CENP-B	Pos	26	0
	Neg	107	100
Scl70	Pos	13	0
	Neg	120	100
Jo-1	Pos	12	0
	Neg	121	100

* Of the 3 discrepant samples testing negative in the Diametra ENA Profile but positive in ANA Screen, one sample was positive for antibodies against histones, one sample was tested positive for antibodies against SS-B/La and one sample was borderline for Scl-70 antibodies and showed a speckled, nucleolar fluorescence pattern.

Conclusion:

Relative Sensitivity	130/133	97.7%
Relative Specificity	97/100	97.0%
Relative Agreement	227/233	97.4%

10.2. Analytical Sensitivity (Detection Limit)

The analytical sensitivity (Cut-off ratio) was determined using the dilution buffer as blank. The absolute mean was obtained from 12 determinations on two different lots.

The detection limit for each antigen specificity was calculated from the absolute mean plus three standard deviations (SD). The calculated analytical sensitivities are indicated in the table below.

Antigen	Mean (OD 450nm)	SD (OD 450nm)	Analytical Sensitivity (C/O Ratio)
SS-A/Ro	0.010	0.002	0.073
SS-B/La	0.008	0.002	0.071
SmD1	0.010	0.002	0.051
U1-snRNP	0.012	0.002	0.085
Histones	0.010	0.003	0.095
CENP-B	0.010	0.003	0.084
Scl70	0.010	0.003	0.068
Jo-1	0.011	0.003	0.090

10.3. Interference

Potentially interfering substances have been evaluated by spiking three low positive samples with bilirubin at 0.2 mg/mL, hemoglobin at 400 mg/dL and lipid at 15 mg/mL.

The following table lists the tested substances in their final concentration which has been set to a level above physiologically relevant concentration.

Substance	Concentration
Bilirubin	0.2 mg/mL
Hemoglobin	4.0 mg/mL
Lipids	15 mg/mL

In general no interference could be observed by any of the tested substances with positive and negative controls up to the stated concentrations. However, in case of assaying in particular strongly hemolytic (hemoglobin > 4.0 mg/mL) and icteric (bilirubin > 0.2 mg/mL) or lipemic samples, potential interference should be taken into account leading to false results.

10.4. Precision

10.4.1. Intra-assay

For determination of the intra-assay imprecision three sera were assayed eight times each in one assay.

High positive sample			
Antigen	Mean (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	1.414	0.053	3.8
SS-B/La	0.715	0.034	4.8
SmD1	0.802	0.023	2.8
U1-snRNP	1.075	0.049	4.6
Histones	1.123	0.025	2.3
CENP-B	1.163	0.047	4.0
Scl70	1.216	0.048	3.9
Jo-1	1.103	0.021	1.9

Positive sample			
Antigen	Mean (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	1.079	0.027	2.5
SS-B/La	0.654	0.031	4.7
SmD1	0.546	0.019	3.4
U1-snRNP	0.890	0.036	4.1
Histones	0.765	0.037	4.8
CENP-B	0.793	0.022	2.8
Scl70	0.857	0.030	3.5
Jo-1	0.793	0.021	2.7

Negative sample			
Antigen	Mean (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	0.263	0.009	3.4
SS-B/La	0.094	0.005	4.9
SmD1	0.107	0.006	6.0
U1-snRNP	0.171	0.008	4.9
Histones	0.151	0.006	4.1
CENP-B	0.150	0.006	4.2
Scl70	0.136	0.004	3.2
Jo-1	0.105	0.004	3.8

The obtained data showed an intra-assay reproducibility of CV 1.9 – 6.0 %.

10.4.2. Inter-assay

For determination of the inter-assay imprecision six sera were assayed eight times each on three different runs.

High positive sample			
Antigen	Mean (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	1.269	0.06	4.9
SS-B/La	0.512	0.05	9.8
SmD1	0.703	0.03	4.0
U1-snRNP	0.930	0.04	4.6
Histones	0.897	0.02	2.2
CENP-B	0.927	0.05	5.5
Scl70	0.833	0.04	4.7
Jo-1	0.665	0.04	6.1

Positive sample			
Antigen	Mean (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	0.837	0.05	5.8
SS-B/La	0.306	0.03	8.7
SmD1	0.414	0.01	3.4
U1-snRNP	0.573	0.07	11.9
Histones	0.583	0.01	2.6
CENP-B	0.553	0.04	6.3
Scl70	0.486	0.03	6.7
Jo-1	0.387	0.03	6.7

Negative sample			
Antigen	Mean (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	0.248	0.01	5.8
SS-B/La	0.080	0.01	9.6
SmD1	0.099	0.01	5.2
U1-snRNP	0.162	0.02	13.4
Histones	0.148	0.01	5.4
CENP-B	0.139	0.01	9.5
Scl70	0.131	0.01	6.0
Jo-1	0.100	0.01	6.2

The obtained data confirm a good inter-assay reproducibility of CV 2.2 – 13.4%.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Damoiseaux J.G., Tervaert J.W., Autoimmun Rev. 5, 10-17 (2006)
2. Egner W., J. Clin. Pathol. 53, 424-432 (2000)
3. Conrad K. *et al.*, Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases – A Diagnostic Reference; Pabst Science

Ed. 01/2015

DCM119-1

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM119-1
Ed. 01/2015

ENA Profile

para análisis de rutina

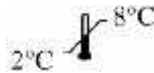
Determinación inmunoenzimática indirecta de los anticuerpos IgG contra ENA (antígenos nucleares extraíbles) en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO119

USO PREVISTO

El kit ENA Profile es un ensayo inmunoenzimático indirecto en fase sólida (ELISA) desarrollado para la determinación cualitativa de los anticuerpos de clase IgG directos contra los antígenos nucleares extraíbles (ENA) en el suero o plasma humano. El ensayo es para uso diagnóstico in vitro de las enfermedades del tejido conectivo.

El kit ENA Profile está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

Los anticuerpos contra los antígenos nucleares extractables son característicos de algunas enfermedades reumáticas, pueden contribuir en el diagnóstico y pronóstico del Lupus Eritematoso Sistémico (LES), en el síndrome de Sjogren, en la enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD), en la esclerodermia, en la poli dermatomiositis y en el síndrome de CREST.

El kit Diametra ENA Profile permite la determinación simultánea de los anticuerpos específicos para: SS-A/Ro, SS-B/La, SMD1, U1-snRNP, Scl70, Jo1, Histona y Centromero B.

Antígeno SS-A/Ro: SS-A 60 kDa, síndrome de Sjogren SS-A 52 kDa (~90%), LES (50%)

Antígeno SS-B/La: SS-B síndrome de Sjogren (85%).

Antígeno SMD1: péptido SMD1 SLE (70%).

Antígeno U1-snRNP: RNP A, RNP C, RNP 68kDa, MCTD (100%).

Antígeno Scl70: Topoisomerasa I Sclerosis Sistémica (70%).

Antígeno Jo1: Histidil tRNA Sintetasa, polimiositis/dermatomiositis (25-30%).

Antígeno Histona: Histona 2A, 2B, 3, 4 SLE fármaco inducida (95%), LES (25-50%).

Antígeno Centromero B: Proteína B asociada al Centromero (80kDa) síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, disturbios en la motilidad del esófago, Esclerodactilia y Telangiectasias)

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test se basa en la absorción de los antígenos nucleares extractables (nativos, recombinantes y peptídicos) a la microplaca y la sucesiva unión de los anticuerpos ENA. Los anticuerpos ligados se

detectan con un anticuerpo secundario dirigido contra las IgG humanas, marcado con peroxidasa. Después de agregar el sustrato aparece una coloración cuya intensidad es proporcional a la concentración de anticuerpos presentes. Después de la adición de la solución stop, el color vira de azul a amarillo.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibrador Control (1 frasco, 3 mL)

REF DCE002/11906-0

2. Control Negativo (1 frasco, 3 mL)

Basado en suero humano

REF DCE045/11901-0

3. Conjugado (1 frasco, 15 mL)

Anticuerpo anti h-IgG conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/11902-0

4. Microplaca recubierta con DGP

Antígenos adsorbidos: SS-A/Ro (strip A1-12), SS-B/La (B1-12), SMD1 (C1-12), U1-snRNP (D1-12), Histona (E1-12), CENP-B (F1-12), Scl70 (G1-12) and Jo-1 (H1-12)

REF DCE002/11903-0

5. Diluyente de muestra (1 frasco, 100 mL)

Tampón fosfato

REF DCE053/11953-0

6. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂ 3 mM, TMB 1.2 mM (evítese el contacto con la piel)

REF DCE004/11904-0

7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,5M (evítese el contacto con la piel)

REF DCE005/11905-0

8. Solución de lavado conc. 20X (1 frasco, 50 mL)

Tampón Tris

REF DCE007/11907-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-690 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8 °C.

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 4 (Microplaca Recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierta, la microplaca se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN_3) o MIT (2-Methyl-4-isothiazolin-3-on) como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/ H_2O_2 a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus

recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.

- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de parada. Tanto el sustrato como la Solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de la muestra

El ensayo ENA Profile puede utilizar suero o plasma humano. Utilice siempre muestras frescas o congeladas a -20°C. **Congelar y descongelar un vez no más.** No utilice muestras inactivadas con calor a 56°C. Antes del ensayo llevar la muestra a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. **Diluir las muestras 1:101 con el diluyente de muestras** (reactivo 5) (ejemplo: 10µL de muestra más 1 mL de diluyente).

6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la "Solución de lavado conc. 20X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución

de 1:20. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8°C durante al menos 30 días.

6.3. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C).**
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.

1. Pipetear 8 veces 100 µL de la muestra del paciente, el control negativo (NC) y el calibrador control (CAL) en la microplaca siguiendo el esquema indicado a continuación:

	1	2	3	...	12	antígeno
A	NC	CAL	muestra 1	...	muestra 10	SS-A/Ro
B	NC	CAL	muestra 1	...	muestra 10	SS-B/la
C	NC	CAL	muestra 1	...	muestra 10	SmD1
D	NC	CAL	muestra 1	...	muestra 10	U1-snRNP
E	NC	CAL	muestra 1	...	muestra 10	Histona
F	NC	CAL	muestra 1	...	muestra 10	CENP-B
G	NC	CAL	muestra 1	...	muestra 10	Scl70
H	NC	CAL	muestra 1	...	muestra 10	Jo-1

2. Cubrir la microplaca con el papel adhesivo e incubar 1 hora a temperatura ambiente (22-28°C).
3. Descartar la solución. Lavar los pozos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.
4. Agregar 100 µL de Conjugado, cubrir la microplaca con el papel adhesivo.
5. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C)
6. Descartar la solución. Lavar los pozos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.
7. Agregar 100 µL de TMB sustrato, incubar 10 minutos a temperatura ambiente (22-28°C)
8. Agregar 100 µL de solución de parada.
9. Leer la absorbancia (E) a 450nm dentro de 10 minutos. Se aconseja una lectura bicromática con una longitud de onda de referencia de 620-690nm.

7. CONTROL DE CALIDAD

7.1. Validación del test

Los resultados del test se consideran validos si los criterios siguientes se cumplen:

- Absorbancia del Calibrador Control (CAL) igual o superior a 0.3
- Absorbancia del Calibrador Control (CAL) menor de 3.2
- Opcional: [CAL]>[NC]

8. Resultados

8.1. Interpretación de resultados

La interpretación de los resultados se efectua comparando las absorbancias del Calibrador Control (CAL) y de las muestras.

Para cada antígeno la absorbancia del Cut-Off se calcula de la forma siguiente:

OD_{Cut-Off} = OD [CAL] x factor específico (ver certificado de analisis)

- Absorbancias > 1.1 veces la absorbancia del Cut-Off se consideran positivas
- Absorbancias < 0.9 veces la absorbancia del Cut-Off se consideran negativas
- Absorbancias entre 0.9-1.1 veces la absorbancia del Cut-Off se consideran dudosas

Ejemplo de calculo:

	Antígeno	OD CAL	Factor	OD Cut-off	OD Muestra	Resultado
A	SS-A/Ro	1.393	0.21	0.293	1.379	Pos
B	SS-B/la	0.562	0.55	0.309	2.442	Pos
C	SmD1	0.843	0.58	0.489	0.056	Neg
D	U1-snRNP	1.069	0.33	0.353	0.060	Neg
E	Histona	1.009	0.38	0.383	0.100	Neg
F	CENP-B	1.089	0.30	0.327	0.044	Neg
G	Scl70	1.025	0.44	0.451	0.096	Neg
H	Jo-1	0.870	0.43	0.374	0.055	Neg

9. LIMITACIONES

Un resultado positivo debe interpretarse de acuerdo a la clínica y al protocolo diagnostico. Los valores obtenidos con el ensayo se consideran de ayuda en el diagnostico. Valores elevados de anticuerpos anti nucleares pueden darse en sujetos sin evidencia clínica de la enfermedad. Si el paciente presenta elevados niveles de complejos inmunes u otra clase de agregados de inmunoglobulinas, pueden darse resultados falsos positivos debido a enlaces inespecíficos.

10. PARAMETROS CARACTERISTICOS

10.1. Sensibilidad y Especificidad Diagnostica

Se ensayaron 133 muestras de pacientes positivos para estudiar la sensibilidad diagnostica del ensayo Diametra ENA Profile. La especificidad se determinó utilizando 100 muestras de donadores de sangra aparentemente sanos:

		Positivo	Negativo
Resultados acumulados	Pos	130	3
	Neg	3*	97
SS-A/Ro	Pos	45	0
	Neg	88	100
SS-B/La	Pos	24	0
	Neg	109	100
SmD1	Pos	18	0
	Neg	115	100

U1-snRNP	Pos	18	1
	Neg	115	99
Histonas	Pos	18	2
	Neg	115	98
CENP-B	Pos	26	0
	Neg	107	100
Scl70	Pos	13	0
	Neg	120	100
Jo-1	Pos	12	0
	Neg	121	100

*De las 3 muestras discordantes negativas para el ensayo ENA Profile pero positivas con el ANA Screen, una muestra resultó positiva para anticuerpos anti Histonas, otra positiva para los anticuerpos anti SS-B/La y la tercera border line para Scl-70 (en fluorescencia se observó un patrón nucleolar)

Conclusiones:

Sensibilidad relativa	130/133	97.7%
Especificidad relativa	97/100	97.0%
Coincidencia relativa	227/233	97.4%

10.2. Sensibilidad analítica (Límite de Detección)

La sensibilidad analítica (en relación al Cut-Off) ha sido determinada utilizando la solución diluyente como blanco. La media absoluta se obtuvo a partir de 12 replicas en dos lotes distintos. El límite de detección para cada antígeno se calculó a partir de la media absoluta más 3 desviaciones estándar (SD). La sensibilidad analítica se ilustra en la tabla siguiente:

Antígeno	Media (OD 450nm)	SD (OD 450nm)	Snsibilidad analítica (Relación C/O)
SS-A/Ro	0.010	0.002	0.073
SS-B/La	0.008	0.002	0.071
SmD1	0.010	0.002	0.051
U1-snRNP	0.012	0.002	0.085
Histonas	0.010	0.003	0.095
CENP-B	0.010	0.003	0.084
Scl70	0.010	0.003	0.068
Jo-1	0.011	0.003	0.090

10.3. Interferencias

Se evaluaron posibles interferencias añadiendo a 3 muestra positivas con valores bajos, las sustancias en las concentraciones detalladas en la tabla a continuación:

Sustancia	Concentración
Bilirrubina	0.2 mg/mL
Hemoglobina	4.0 mg/mL
Lípidos	15 mg/mL

No ha sido observada interferencia con cualquiera de las sustancias ensayadas hasta las concentraciones indicadas. Aun así en muestra altamente hemolizadas, ictéricas o lipemicas en

concentraciones superiores a las ensayadas, deben evaluarse la posibilidad de interferencias que podrían conducir a resultados falsos positivos.

10.4. Precisión

10.4.1. Intra-ensayo

Para determinar el coeficiente de variación intra-ensayo, se ensayaron 3 muestras con 8 replicas cada una:

Muestras altamente positivas			
Antígeno	Media (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	1.414	0.053	3.8
SS-B/La	0.715	0.034	4.8
SmD1	0.802	0.023	2.8
U1-snRNP	1.075	0.049	4.6
Histonas	1.123	0.025	2.3
CENP-B	1.163	0.047	4.0
Scl70	1.216	0.048	3.9
Jo-1	1.103	0.021	1.9

Muestras Positivas			
Antígeno	Media (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	1.079	0.027	2.5
SS-B/La	0.654	0.031	4.7
SmD1	0.546	0.019	3.4
U1-snRNP	0.890	0.036	4.1
Histonas	0.765	0.037	4.8
CENP-B	0.793	0.022	2.8
Scl70	0.857	0.030	3.5
Jo-1	0.793	0.021	2.7

Muestras negativas			
Antígeno	Media (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	0.263	0.009	3.4
SS-B/La	0.094	0.005	4.9
SmD1	0.107	0.006	6.0
U1-snRNP	0.171	0.008	4.9
Histonas	0.151	0.006	4.1
CENP-B	0.150	0.006	4.2
Scl70	0.136	0.004	3.2
Jo-1	0.105	0.004	3.8

La variación intra-ensayo es de 1.9 – 6.0%.

10.4.2. Inter-ensayo

Para determinar el coeficiente de variación inter-ensayo, se ensayaron 6 muestras con 8 replicas cada una en tres distintos lotes:

Muestras altamente positivas			
Antígeno	Media (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	1.269	0.06	4.9
SS-B/La	0.512	0.05	9.8
SmD1	0.703	0.03	4.0
U1-snRNP	0.930	0.04	4.6
Histonas	0.897	0.02	2.2
CENP-B	0.927	0.05	5.5
Scl70	0.833	0.04	4.7
Jo-1	0.665	0.04	6.1

Muestras positivas			
Antígeno	Media (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	0.837	0.05	5.8
SS-B/La	0.306	0.03	8.7
SmD1	0.414	0.01	3.4
U1-snRNP	0.573	0.07	11.9
Histonas	0.583	0.01	2.6
CENP-B	0.553	0.04	6.3
Scl70	0.486	0.03	6.7
Jo-1	0.387	0.03	6.7

Muestras negativas			
Antígeno	Media (OD 450nm)	SD	CV %
SS-A/Ro	0.248	0.01	5.8
SS-B/La	0.080	0.01	9.6
SmD1	0.099	0.01	5.2
U1-snRNP	0.162	0.02	13.4
Histonas	0.148	0.01	5.4
CENP-B	0.139	0.01	9.5
Scl70	0.131	0.01	6.0
Jo-1	0.100	0.01	6.2

La variación inter-ensayo es de 2.2 – 13.4%.

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Damoiseaux J.G., Tervaert J.W., Autoimmun Rev. 5, 10-17 (2006)
2. Egner W., J. Clin. Pathol. 53, 424-432 (2000)
3. Conrad K. *et al.*, Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases – A Diagnostic Reference; Pabst Science

Ed. 01/2015

DCM119-1

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs