

ANA Screening IgG

**Enzyme Immunoassay (ELISA) for the qualitative
determination of IgG antibodies
to anti Nuclear Antigens
in human serum and plasma**

- for "in vitro" diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

ANA Screening IgG

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the qualitative determination of IgG auto-antibodies to dsDNA, histones, SSA, SSB, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centromere and other antigens extracted from the HEp-2 nucleus, in human plasma and sera.

For in vitro diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Autoimmunity is the failure of an organism to recognize its own constituent parts as *self*, which allows an immune response against its own cells and tissues. Any disease that results from such an aberrant immune response is termed an *Autoimmune Disease*.

Rheumatoid autoimmune diseases are often associated with *auto-antibodies to Nuclear Antigens*. We can distinguish between *Anti Nuclear Antibodies (ANA)*, associate with autoimmune systemic diseases as SLE (Systemic Lupus Erythematosus), RA (Reumatoid Arthritis), Scleroderma, MCDT (Mixed Connective Tissue Disease) and Sjogren's Syndrome; and *Extractable anti Nuclear Antibodies (ENA)*, associate with autoimmune systemic disease as Polymyositis, SLE, MCDT and Sjogren's Syndrome.

The serological detection of antinuclear antibodies (ANA) in patient with suspected autoimmune disorders is common practice in every immunological laboratory. When this first diagnostic step is performed with positive results, we can go along with the isolate detection and quantification of the individual antibodies.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with antigens dsDNA, histones, SSA, SSB, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centromere and other antigens extracted from the HEp-2 nucleus.

In the 1st incubation, the solid phase is treated with diluted samples and anti nuclear IgG are captured, if present, by the solid phase.

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti nuclear IgG are detected by the addition of anti hlgG antibody, labeled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti nuclear IgG antibodies present in the sample. The presence of IgG in the sample may therefore be determined by means of a cut-off value able to discriminate between negative and positive samples.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 breakable wells coated with antigens dsDNA, histones, SSA, SSB, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centromere and other antigens extracted from the HEp-2 nucleus.

Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

2. Negative Control: CONTROL -

1x2.0 ml/vial. It contains, human Serum negative for ANA IgG antibodies, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0

+/-0.1, 10% Fetal Calf serum, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The Negative Control is pale yellow color coded.

3. Positive Control: CONTROL +

1x2.0 ml/vial. It contains, human Serum positive for ANA IgG antibodies, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 10% Fetal Calf serum, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The Positive Control is green color coded.

4. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle 20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

5. Enzyme conjugate: CONJ

1x16ml/vial. Ready to use and red colour coded. It contains Horseradish peroxidase conjugated goat polyclonal antibodies to human IgG, 5% BSA, 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

6. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

1x16ml/vial. It contains 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetramethyl benzidine (or TMB) and 0.02% hydrogen peroxide (or H₂O₂).

Note: To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.

7. Sulphuric Acid: H2SO4 0.3 M

1x15ml/vial. It contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

8. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 10% Fetal Calf Serum (FCS), 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

The specimen diluent is violet-blue color coded.

9. Plate sealing foils n°2

10. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (1000, 100 and 10ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bi-distilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator (dry or wet) set at +37°C (+/-0.5°C tolerance).
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible for the laboratory.

2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the

National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and micro-plates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
5. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six uses of the device and up to 3 months.
11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..
14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water
16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.

2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.

3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of manufacturing.

In this case call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back into the aluminium pouch, in presence of desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2...8°C. When opened the first time, residual strips are stable till the indicator of humidity inside the desiccant bag turns from yellow to green.

Negative and Positive Controls:

Ready to use component. Mix carefully on vortex before use.

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bi-distilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sample Diluent:

Ready to use component. Mix carefully on vortex before use.

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.
An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The ELISA micro-plate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; repeatability ≥ 1%. The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer 's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system

of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the micro-plate, is not punctured or damaged.
5. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
6. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
7. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturer's instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
8. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
9. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
10. Check that the micropipettes are set to the required volume.
11. Check that all the other equipment is available and ready to use.
12. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Controls as they are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Negative Control in triplicate and 100 µl of Positive Control in single. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate with an automatic washer reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

- Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 5.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the A1 well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) in the dark for 15 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid to stop the enzymatic reaction into all the wells. Addition of acid will turn the positive control and the positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory).

General Important notes:

- Ensure that no finger prints are present on the bottom of the micro-well before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
- Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Samples diluted 1:101 and Controls	100 µl
1st incubation	45 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	45 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3rd incubation	15 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 4										
B	NC	S 5										
C	NC	S 6										
D	NC	S 7										
E	PC	S 8										
F	S 1	S 9										
G	S 2	S 10										
H	S 3	S 11										

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control
PC = Positive Control S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified.

Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.050 OD450nm value
Negative Control (NC)	< 0.200 mean OD450nm after blanking
Positive Control (PC)	> 0.750 mean OD450nm value after blanking

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further and operate as follows:

Problem	Check
Blank well OD450nm > 0.050	1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
Negative Control OD450nm value after blank > 0.200	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive control instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative control or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
Positive Control OD450nm < 0.750	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (e.g.: dispensation of a wrong control instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the control has occurred.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 11.

P. RESULTS

The test results are calculated by means of the mean OD450nm/620-630nm value of the Negative Control (NC) and a mathematical calculation, in order to define the following cut-off formulation:

$$\text{Cut-Off} = \text{NC} + 0.250$$

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

Important note: When the calculation of results is performed by the operating system of an ELISA automated work station, ensure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the correct interpretation of results.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as a ratio of the sample OD450nm/620-630nm and the Cut-Off value (or S/Co) according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 0.8	Negative
0.8 - 1.1	Equivocal
> 1.1	Positive

A **negative result** indicates that the patient have a normal value of ANA antibodies.

Any patient showing an **equivocal result**, should be re-tested by examining a second sample taken from the patient in a different collection.

A **positive result** is indicative of an elevated value of ANA antibodies. In this case the patient should be submitted to specific tests able to point out which specific ANA antibody is elevated.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 11).

Important Note: The following data must not be used instead of real figures obtained by the user.

Negative Control: 0.050 – 0.070 – 0.060 OD450nm
 Mean Value: 0.060 OD450nm
 Lower than 0.200 – Accepted
 Positive Control: 2.350 OD450nm
 Higher than 0.750 – Accepted
 Cut-Off = 0.060+0.250 = 0.310

Sample 1: 0.070 OD450nm
 Sample 2: 1.690 OD450nm
 Sample 1 S/Co < 0.8 = negative
 Sample 2 S/Co > 1.1 = positive

Important notes:

- Results of this test alone are not enough to provide a clear diagnosis of a autoimmune disease. Other diagnostic tests should be carried out, especially the quantification of individual antibodies. The pattern of different antibody combinations and their concentration together with the whole clinical picture of the patient are

helpful diagnostic tools in the assessment of rheumatoid autoimmune diseases.

- Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
- When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted on panels of positive and negative samples with reference to a CE marked reference kit.

1. Limit of detection

No international standard has been defined so far by the European Community.

In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a human plasma which contains all auto antibodies with high concentration, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

The limit of detection has been calculated as mean OD450nm/620-630nm Negative Control A1 well + 5 SD.

The table below reports the mean OD450nm/620-630nm values of this standard when diluted and then examined in the assay.

Internal Gold Standard (IGS) OD450nm/620-630nm values:

IGS Dilution	Lot P1 OD 450nm/620-630nm	Lot P2 OD OD 450nm/620-630nm
1:100	2.838	2.797
2X	1.695	1.876
4X	1.018	1.109
8X	0.483	0.502
16X	0.301	0.361
SD	0.010	0.008

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The diagnostic sensitivity has been tested in a Performance Evaluation trial on panels of samples classified positive by a CE marked reference kit.

The diagnostic **sensitivity** was studied on at least 50 samples, positive with the reference kit. Positive samples were collected from patients with a clinical history of autoimmune disease.

The diagnostic **specificity** was determined on panels of at least 50 negative samples from normal individuals and blood donors, classified negative with the reference kit, including potentially interfering specimens.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the specificity. No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed.

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

No cross-reactivity's have been observed.

The Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

3. Precision:

The negative control and the positive control were used to verify this parameter, by testing 12 replicates of the same sample on two lots of product. The values of CV% obtained from this study ranged 4-20% depending on OD450nm/620-630nm values. The variability shown did not result in sample misclassification.

S. LIMITATIONS

Bacterial contamination or heat inactivation of the specimen may affect the absorbance values of the samples with consequent alteration of the level of the analyte.

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing may generate some false results.

This test is suitable only for testing single samples and not pooled ones.

Diagnosis of an autoimmune disease should not be established on the basis of a single test result. The patient's clinical history, symptomatology, as well as other diagnostic data should be considered.

False positivity has been assessed as less than 2% of the normal population.

T. REFERENCES

1. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. K Miyachi, MJ Fritzler, EM Tan - The Journal of Immunology, 1978 - Am Assoc Immunol
2. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. EM Tan - Advances in immunology, 1982 - ncbi.nlm.nih.gov
3. Antinuclear antibody with distinct specificity for polymyositis. JF Wolfe, E Adelstein, GC Sharp - Journal of Clinical Investigation, 1977 - pubmedcentral.nih.gov

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with EN ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy



ANA Screening IgG

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la
determinación cualitativa de anticuerpos IgG
contra antígenos antinucleares
en plasma y suero humanos**

- Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"-



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20077 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

IgG de cribado ANA

C. OBJETIVO DEL EQUIPO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa de autoanticuerpos IgG frente a ADN bicatenario, histonas, SSA, SSB, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centrómero y otros antígenos extraídos del núcleo de HEP-2, en plasma y suero humanos.

Uso exclusivo para diagnóstico in vitro.

D. INTRODUCCIÓN

La **autoinmunidad** es el fallo de un organismo para reconocer sus partes constituyentes como *propias*, lo que permite una respuesta inmunitaria contra sus propias células y tejidos. Toda enfermedad causada por esa respuesta inmunitaria aberrante se denomina *enfermedad autoinmune*.

Las *enfermedades autoinmunes reumatoideas* suelen estar asociadas con *autoanticuerpos* contra *antígenos nucleares*. Podemos distinguir entre *anticuerpos antinucleares* (ANA), asociados con enfermedades autoinmunes sistémicas como LES (lupus eritematoso sistémico), AR (artritis reumatoide), esclerodermia, EMTC (enfermedad mixta del tejido conectivo) y síndrome de Sjögren; y *anticuerpos antinucleares extraíbles* (ENA), asociados con enfermedades autoinmunes sistémicas como polimiositis, LES, EMTC y síndrome de Sjögren.

La detección serológica de anticuerpos antinucleares (ANA) en pacientes sospechosos de padecer trastornos autoinmunes es práctica común en todos los laboratorios inmunológicos. Cuando se realiza la primera fase del diagnóstico con resultados positivos, podemos seguir con la detección y cuantificación aisladas de los anticuerpos individuales.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

Las microplacas están recubiertas con antígenos ADN bicatenario, histonas, SSA, SSB, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centrómero y otros antígenos extraídos del núcleo de HEP-2.

En la 1ª incubación, la fase sólida se trata con muestras diluidas y las IgG antinucleares son capturadas, si las hay, por la fase sólida.

Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la 2ª incubación se detectan las IgG antinucleares unidas por la adición de anticuerpo anti hIgG, marcado con peroxidasa (HRP).

El enzima capturado en la fase sólida, combinado con la mezcla sustrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG antinucleares presentes en la muestra. La presencia de IgG en la muestra se puede determinar por lo tanto mediante un valor de corte capaz de discriminar entre muestras negativas y positivas.

D. COMPONENTES.

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplacas: MICROPLATE

12 tiras x 8 pocillos rompibles recubiertos con antígenos ADN bicatenario, histonas, SSA, SSB, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centrómero y otros antígenos extraídos del núcleo de HEP-2.

Las placas están en una bolsa sellada con desecante. Dejar la microplaca a temperatura ambiente antes de abrirla, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y conservar a 4°C.

2. Control negativo: CONTROL

1x2.0 ml/vial. Contiene suero humano negativo para anticuerpos IgG ANA, 2% de caseína, tampón de citrato sódico 10 mM a pH 6.0 +/-0.1, 10% de suero fetal bovino, además de azida sódica al 0.09% y ProClin 300 al 0.045% como conservantes.

El control negativo está codificado con el color amarillo.

3. Control positivo: CONTROL+

1x2.0 ml/vial. Contiene suero humano positivo para anticuerpos IgG ANA, 2% de caseína, tampón de citrato sódico 10 mM a pH 6.0 +/-0.1, 10% de suero fetal bovino, además de azida sódica al 0.09% y ProClin 300 al 0.045% como conservantes.

El control positivo está codificado con el color verde.

4. Solución de Lavado Concentrada: WASHBUF 20X

1x60 ml/botella solución concentrada 20x. Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0.045%

5. Conjugado: CONJ

1x16ml/vial. Listo para el uso y codificado con color rojo. Contiene anticuerpos policlonales de cabra anti IgG humana conjugados con peroxidasa (HRP), 5% de albúmina de suero bovino, tampón Tris 10 mM a pH 6.8 +/-0.1, ProClin 300 0.045% y sulfato de gentamicina 0.02% como conservantes.

6. Cromógeno/ Substrato: SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, dimetilsulfóxido 4%, tetrametil benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02%.

Nota: Evitar la exposición a la luz, la sustancia es fotosensible.

7. Ácido Sulfúrico: H₂SO₄ 0.3M

1x15ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M
Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

8. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60 ml/vial. Contiene 2% de caseína, tampón citrato sódico 10mM a pH 6.0 +/-0.1, 10% de suero fetal bovino (SFB), además de azida sódica al 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. Utilizar para diluir la muestra.

El diluyente de muestras está codificado con el color violeta.

9. Sellador adhesivo n.º 2

10. Manual de instrucciones n.º 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (1000, 100 y 10 µl) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. *Timer* con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) ajustado a 37°C (+/-0.5°C de tolerancia).
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El equipo sólo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.
2. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire al abrir los viales del equipo y las microplacas, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del substrato a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar componentes de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos del mismo lote.
7. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el producto después de la fecha de vencimiento indicada en el equipo e internamente en los reactivos. Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en equipos abiertos empleándolos hasta seis veces y en uso por un período de hasta 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones cruzadas.
13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de

infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Se recomienda el uso del código de barras.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0.2-0.8 micras.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación.

De ser así, llame al servicio de atención al cliente de Dia.Pro. Las tiras de pocillos no utilizadas deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Cuando se abre por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambia de amarillo a verde.

Controles negativo y positivo:

Reactivo listo para usar. Mezclar cuidadosamente en un vórtex antes de usar.

Solución de lavado concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada y mezclarse delicadamente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable durante una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

Conjugado:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Cromógeno/ Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Diluyente de muestras:

Reactivo listo para usar. Mezclar cuidadosamente en un vórtex antes de usar.

Ácido Sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

Indicación de peligro, **Frases H**

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, **Frases P**

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

- Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
- El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro (620-630nm, obligatorio) para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda $\leq 10\text{nm}$ b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2.0 , c) Linealidad ≥ 2.0 , reproducibilidad $\geq 1\%$. El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
- En caso de usar un sistema automatizado ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de contaminación de pocillos adyacentes. Se recomienda el uso de sistemas automatizados cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
- El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requisitos descritos. También se ofrece apoyo para la instalación de nuevos instrumentos a usar con el equipo.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

- Las micropipetas deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol al 70%, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de $\pm 2\%$. También se debe llevar a cabo de forma regular la descontaminación de derrames o residuos de los componentes del equipo.
- El incubador ELISA debe ser ajustado a 37°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$ de tolerancia) y controlado periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadores secos o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
- El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

- Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del equipo (envase primario). No usar si ha caducado.
- Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles.
- Comprobar que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico.
- Comprobar que no han ocurrido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Comprobar que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no está perforada ni dañada.
- Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
- Dejar los componentes restantes hasta alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
- Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y alimentar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
- Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
- En caso de trabajar automáticamente, encender el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
- Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.

- Asegurarse de que el resto de equipamiento esté disponible y listo para el uso.
- En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

- Diluir las muestras 1:101 en un tubo de dilución adecuadamente definido (ejemplo: 1000 µl de diluyente de muestras + 10 µl de muestra). No diluir los controles, ya que están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente todos los componentes líquidos en un vórtex y después proceder como se describe a continuación.
- Poner el número de tiras necesarias en el soporte plástico. Dejar el pocillo A1 vacío para la operación de blanco.
- Dispensar 100 µl de control negativo por triplicado y 100 µl de control positivo sin duplicar. A continuación, dispensar 100 µl de muestras diluidas en cada pocillo adecuadamente identificado.
- Incubar la microplaca **45 min a +37°C**.

Nota importante: Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado sólo cuando se hace el ensayo manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.

- Lavar la microplaca con el lavador automático según se indica (sección I.3).
- Dispensar 100 µl de conjugado en cada pocillo, excepto en el pocillo A1, y cubrir con el sellador. Comprobar que este componente de color rojo ha sido dispensado en todos los pocillos.

Nota importante: Tener cuidado de no tocar la pared interna de plástico del pocillo con la punta de la pipeta que contiene el conjugado. Podría producirse contaminación.

- Incubar la microplaca **45 min a +37°C**.
- Lavar la microplaca, de igual forma que en el paso 5.
- Dispensar 100 µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1. Incubar después la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) en la oscuridad durante 15 minutos**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se puede generar un fondo excesivo.

- Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática. La adición del ácido cambia el color del control positivo y las muestras positivas de azul a amarillo.
- Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio).

Notas generales importantes:

- Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
- La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO.

Método	Operaciones
Muestras diluidas 1:101 y controles	100 µl
1^{ra} incubación	45 min
Temperatura	+37°C
Paso de lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado	100 µl
2^{da} incubación	45 min
Temperatura	+37°C
Paso de lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H2O2	100 µl
3^{ra} incubación	15 min
Temperatura	t.a.*
Ácido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm/620-630nm

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M 4										
B	CN	M 5										
C	CN	M 6										
D	CN	M 7										
E	CP	M 8										
F	M 1	M 9										
G	M 2	M 10										
H	M 3	M 12										

Leyenda: BL = Blanco CN = Control Negativo
CP = Control positivo M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza una comprobación para validar los controles siempre que se utiliza el equipo, para verificar si el rendimiento del ensayo es el homologado.

Controlar que los datos siguientes coinciden:

Compruebe que	Exigencia
Pocillo blanco	valor < 0.050 DO450nm
Control negativo (CN)	Valor medio < 0.200 DO450nm después de leer el blanco
Control Positivo (CP)	Valor medio > 0.750 de DO450nm después de leer el blanco

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pase a la siguiente sección.

En caso contrario, no continuar y hacer lo siguiente:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco DO450nm	1. la solución cromógeno/substrato no se > 0.050 ha contaminado durante el ensayo.
Control negativo DO450nm después de leer el blanco	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido alimentado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del

	control negativo ni de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas ni con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
Control Positivo DO450nm < 0.750	1. el procedimiento ha sido ejecutado correctamente. 2. no se han cometido errores en su distribución (por ejemplo, dispensar un control equivocado en su lugar). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control.

Si se produce alguno de esos problemas, tras la comprobación, informe al responsable para tomar las medidas pertinentes.

Nota importante:

El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11.

P. RESULTADOS

Los resultados de la prueba se calculan a partir de un valor medio de DO450nm/620-630nm del control negativo (CN), mediante un valor de corte (Co) hallado con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \text{CN} + 0.250$$

El valor encontrado en la prueba es utilizado para la interpretación de los resultados, según se describe a continuación.

Nota importante: Cuando el cálculo de los resultados se halla mediante el sistema operativo de un equipo de ELISA automático, asegurarse de que la formulación usada para el cálculo del valor de corte, y para la interpretación de los resultados sea correcta.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La interpretación de los resultados se realiza mediante la relación entre las DO a 450nm/620-630nm de las muestras (M) y el Valor de corte (Co). Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

M/Co	Interpretación
< 0.8	Negativo
0.8 - 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

Un **resultado negativo** indica que el paciente tiene un valor normal de anticuerpos ANA.

Cualquier paciente cuya muestra **resulte equívoca** debe someterse a una nueva prueba con una segunda muestra de sangre de una extracción distinta.

Un **resultado positivo** es indicativo de un valor elevado de anticuerpos ANA. En este caso el paciente debe someterse a ensayos específicos capaces de indicar el anticuerpo ANA concreto con un valor elevado.

A continuación, un ejemplo de los cálculos a realizar (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11).

Nota importante: Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos en el laboratorio.

Control negativo: 0.050 – 0.070 – 0.060 DO450nm
 Valor medio: 0.060 DO450nm
 Menor de 0.200 – Válido
 Control positivo: 2.350 DO450nm
 Mayor de 0.750 – Válido
 Valor de corte = 0.060+0.250 = 0.310

Muestra 1: 0.070 DO450nm
 Muestra 2: 1.690 DO 450nm
 Muestra 1 M/Co < 0.8 = negativa
 Muestra 2 M/Co > 1.1 = positiva

Notas importantes:

- Los resultados de esta prueba no son suficientes para proporcionar un diagnóstico claro de enfermedad autoinmune. Deben realizarse otras pruebas diagnósticas, especialmente la cuantificación de anticuerpos individuales. El patrón de distintas combinaciones de anticuerpos y su concentración, junto con el cuadro clínico completo del paciente, son herramientas útiles de diagnóstico en la valoración de enfermedades autoinmunes reumatoides.
- La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
- Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.

R. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO.

La evaluación del rendimiento ha sido realizada en paneles de muestras positivas y negativas con respecto a un equipo de referencia con marca CE.

1. Límite de detección.

La Comunidad Europea no ha definido ningún estándar internacional hasta el momento.

Con el objetivo de garantizar una excelente y constante sensibilidad del dispositivo, fue definido un estándar de oro interno (IGS), a partir de plasma humano que contiene todos los autoanticuerpos en alta concentración.

El límite de detección se ha calculado como valor medio de DO450nm/620-630nm del control negativo del pocillo A1 + 5 SD.

La tabla siguiente muestra los valores medios de DO450nm/620-630nm de este estándar cuando se diluye y se examina en el ensayo.

Valores de DO450nm/620-630nm del estándar de oro interno (IGS):

IGS Dilución	Lote P1	Lote P2
	DO 450nm/630-620nm	DO 450nm/630-620nm
1:100	2.838	2.797
2X	1.695	1.876
4X	1.018	1.109
8X	0.483	0.502
16X	0.301	0.361
SD	0.010	0.008

2. Sensibilidad y especificidad diagnóstica:

La sensibilidad diagnóstica ha sido ensayada en una prueba de evaluación del rendimiento en paneles de muestras clasificadas positivas por un equipo de referencia con marca CE.

La **sensibilidad** diagnóstica se estudió en al menos 50 muestras, positivas con el equipo de referencia. Las muestras positivas se obtuvieron de pacientes con una historia clínica de enfermedad autoinmune.

La **especificidad** clínica fue determinada utilizando paneles de al menos 50 muestras negativas, provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas mediante el equipo de referencia, incluyendo muestras que podían interferir potencialmente.

Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero humanos para determinar la especificidad. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

Las muestras congeladas también se han probado para comprobar si la congelación interfiere con el rendimiento del ensayo. No se ha observado interferencia a partir de muestras limpias y libres de agregados.

No se ha observado reactividad cruzada.

En la evaluación del rendimiento se obtuvieron los siguientes valores:

Sensibilidad	≥ 98 %
Especificidad	≥ 98 %

3. Precisión:

El control negativo y el control positivo se utilizaron para verificar este parámetro, probando 12 réplicas de la misma muestra en dos lotes de producto. Los valores de CV% obtenidos a partir del estudio oscilaron entre el 4% y el 20% según los valores de DO450nm/620-630nm. La variabilidad mostrada no dio como resultado una clasificación errónea de las muestras.

S. LIMITACIONES.

Las muestras que después de ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

Las muestras congeladas que contienen partículas de fibrina o agregados tras descongelar pueden generar algunos resultados falsos.

El ensayo es útil solo para probar muestras independientes y no mezclas.

El diagnóstico de una enfermedad autoinmune no debe establecerse en base a un solo resultado. Deben tenerse en consideración la historia clínica del paciente, la sintomatología, así como otros datos diagnósticos.

Se ha evaluado falso positivo en menos del 2% de la población normal.

T. BIBLIOGRAFÍA

1. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. K Miyachi, MJ Fritzler, EM Tan - The Journal of Immunology, 1978 - Am Assoc Immunol
2. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. EM Tan - Advances in immunology, 1982 - ncbi.nlm.nih.gov

3. Antinuclear antibody with distinct specificity for polymyositis.

JF Wolfe, E Adelstein, GC Sharp - Journal of Clinical Investigation, 1977 - pubmedcentral.nih.gov

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado conforme a la norma ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni
(Milán) – Italia



