



DCM098-5
Ed. 01/2015

ENA Screen

per analisi di routine

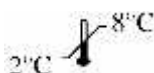
Determinazione quantitativa degli anticorpi IgG contro gli Antigeni Nucleari Estraiibili (ENA) nel siero o plasma umano.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO098

DESTINAZIONE D'USO

Il kit DiaMetra ENA Screen è un test immunoenzimatico (ELISA) indiretto in fase solida sviluppato per la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi di classe IgG diretti contro: Sm (Smith), RNP/Sm, Scl-70, SS-A (Ro) (52kDa e 60kDa), SS-B (La) e Jo-1, presenti nel siero o plasma umano.

Il kit ENA Screen è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Le patologie autoimmuni sono caratterizzate da un alterato funzionamento del sistema immunitario che aggredisce l'organismo stesso. Si ha una modificazione dei meccanismi di riconoscimento cellulare, che non consentono più all'organismo di distinguere il "sé" dal "non sé", ossia gli elementi a esso appartenenti rispetto a quelli a esso estranei. Questo porta ad una produzione di anticorpi che possono colpire singoli organi o innescare malattie sistemiche, danneggiando intere funzioni dell'individuo. I processi che portano all'insorgenza delle patologie autoimmuni restano ancora per molti aspetti sconosciuti.

Le patologie reumatiche autoimmuni sono spesso associate alla presenza di molti autoanticorpi diretti verso antigeni nucleari e citoplasmatici. Questi anticorpi vengono chiamati comunemente anticorpi anti nucleo (ANA) e la loro presenza è importante per diagnosticare diverse patologie del tessuto connettivo. Sebbene la ricerca di ANA sia molto significativa in termini diagnostici, tuttavia risulta essere poco specifica; per questo motivo si sceglie di rilevare la presenza di anticorpi contro gli antigeni nucleari estraibili (ENA). I sei autoanticorpi ENA più significativi e più ricercati sono quelli contro Sm, RNP/Sm, SS-A, SS-B, Scl-70 e Jo-1. L'ENA Screen può fornire importanti informazioni diagnostiche su pazienti che presentano sospette malattie del tessuto connettivo quali: Lupus Eritematoso Sistemico (LES), polimiosite, sindrome di Sj gren, sclerodermia e malattia mista del tessuto connettivo (MCTD). Ogni patologia non presenta un solo parametro specifico, ma risulta nella presenza contemporanea di più parametri, anche se vi sono degli autoanticorpi che più di altri caratterizzano la patologia. Ad esempio nella sindrome di Sj gren sono espressi principalmente anticorpi contro SS-A e SS-B, mentre nella MCTD i più rilevanti sono quelli contro Sm e RNP/Sm.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test ENA Screen si basa sul legame degli anticorpi presenti su siero con gli antigeni Sm, RNP/Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Scl-70, Jo-1 adsorbiti sulla micropiastro. Gli anticorpi presenti nei calibratori, nei controlli o nei campioni prediluiti dei pazienti si legano alla superficie interna dei pozzetti. Dopo 30 minuti di incubazione la micropiastro

viene lavata con tampone di lavaggio per la rimozione delle componenti del siero che non hanno reagito. Una soluzione di immunoglobuline anti-human IgG coniugate con perossidasi riconosce gli anticorpi di classe IgG legati agli antigeni immobilizzati. Dopo 30 minuti di incubazione l'eccesso di coniugato enzimatico che non si è legato specificamente viene rimosso mediante tampone di lavaggio. Si aggiunge ai pozzetti una soluzione substrato cromogenica contenente TMB. Dopo 15 minuti di incubazione si blocca lo sviluppo del colore mediante aggiunta della soluzione stop. Il colore della soluzione diventa giallo. La quantità di colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgG presenti nel campione originale.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONI

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

- Calibrator** (1 flacone, 1,2 mL)
Tampone fosfato 0,1M, NaN₃ < 0,1%, siero umano
CAL1 **REF DCE002/09806-0**
- Controls** (2 flaconi, 1,2 mL ciascuno, pronti all'uso)
Tampone fosfato 0,1M, NaN₃ < 0,1%, siero umano
Negative Control **REF DCE045/09801-0**
Positive Control **REF DCE045/09802-0**
- Sample diluent** (1 flacone, 100 mL)
Tampone fosfato 0,1M NaN₃ < 0,1%
REF DCE053-0
- Conjugate** (1 flacone, 15 mL)
Anti h-IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP), BSA 0,1%, Proclin < 0,0015%
REF DCE002/09802-0
- Coated Microplate** (1 micropiastro breakable)
Antigeni ENA adsorbiti su micropiastro
REF DCE002/09803-0
- TMB Substrate** (1 flacone, 15 mL)
H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)
REF DCE004-0
- Stop Solution** (1 flacone, 15 mL)
Acido solforico 0,15M (evitare il contatto con la pelle)
REF DCE005-0
- 10X Conc. Wash Solution** (1 flacone, 50 mL)
Tampone fosfato 0,2M pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letto per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.
Aprire la busta del Reattivo 5 (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 Calibratori ed i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN₃) o di Proclin 300^R 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 TMB/H₂O₂ 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 2-8°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 (22-28°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.
- **ATTENZIONE: il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente**

usato, può essere contaminato da agenti esterni; si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; **questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso.**

A tale scopo Diametra rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.

- 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 migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- 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. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione del Calibratore (C₁)

Il Calibratore è pronto all'uso.

Dal momento che non sono disponibili preparazioni di riferimento internazionale per gli anticorpi ENA, il sistema di misurazione è calibrato in unità relative arbitrarie. Il valore della concentrazione del Calibratore è riportato sulle etichette.

6.2. Preparazione del campione

Le matrici preferite per la determinazione degli anticorpi ENA sono siero o plasma umano. **Tutti i campioni di siero o plasma devono essere prediluiti 1:100 con sample diluent**; ad esempio, 10 µL di campione possono essere diluiti con 990 µL di sample diluent.

I pazienti non devono necessariamente essere a digiuno e non è richiesta alcuna preparazione particolare. Raccogliere il sangue mediante prelievo venoso in un vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule per centrifugazione.

I campioni possono essere conservati refrigerati a 2-8°C per almeno 5 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi fino a 6 mesi i campioni dovrebbero essere congelati a -20°C. Per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti, i campioni dovrebbero essere aliquotati. Emolisi e presenza di bilirubina non hanno effetti evidenti sulla determinazione.

I Controlli sono pronti all'uso.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni flacone di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (10x) con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₁), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. RISULTATI

7.1. Calcolo dei risultati

Innanzitutto bisogna determinare la media delle assorbanze per ciascun set di duplicati. Quindi per ottenere il valore del campione si deve dividere il valore dell'assorbanza del campione per il valore dell'assorbanza del Calibratore e moltiplicarlo per il valore in AU del Calibratore, stampato sull'etichetta, secondo la seguente formula:

$$Conc. Campione = \frac{O.D. campione}{O.D. C1} \times Conc. C1$$

La reattività non è collegata in modo lineare alla quantità di anticorpi presenti. Infatti, seppur un aumento od una diminuzione della concentrazione di anticorpi risulti in un aumento o diminuzione della reattività, la variazione non è proporzionale (es. il raddoppio della concentrazione di anticorpi non porta necessariamente ad un raddoppio della reattività). Per ottenere una maggiore accuratezza nella determinazione del contenuto di anticorpi si consiglia di testare diluizioni seriali del campione. L'ultima diluizione che risulta positiva nel test rappresenta la concentrazione anticorpale del paziente.

8. VALORI DI RIFERIMENTO

In uno studio sui valori normali eseguito con campioni di siero provenienti da donatori sani sono stati determinati i seguenti intervalli di normalità con il test ENA Screen:

	ENA Screen (AU/mL)
Negativo	< 25
Positivo	25

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

I risultati positivi dovrebbero essere verificati relativamente allo stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione relativa alla terapia dovrebbe essere presa individualmente. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri intervalli normale e patologico di ENA sierici.

Reagente	Calibratore	Campione /Controlli	Bianco
Calibratore C ₁	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. Lavaggi: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			

9. PARAMETRI CARATTERISTICI

9.1. Specificità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 58 sieri (di cui 19 positivi e 39 negativi) hanno mostrato una specificità del 92.3%.

9.2. Sensibilità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 58 sieri (di cui 19 positivi e 39 negativi) hanno mostrato una sensibilità del 94.7%.

9.3. Limite di rilevabilità

La minor concentrazione di anticorpi ENA che può essere distinta dal controllo negativo è di 3,68 AU/mL con limite di confidenza del 95%.

9.4. Precisione e riproducibilità

9.4.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando 16 volte due diversi sieri con valori situati dentro il range di lavoro della curva di calibrazione. La variabilità intra-assay è 8,2%

9.4.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la misura di due differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi e/o con diverse combinazioni di lotti di reagenti. La variabilità inter-Assay è 11,2%.

10. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

BIBLIOGRAFIA

1. Antinuclear antibody The Lancet, September 15,1984:611-13
2. Reichlin,M., Van Venrooij, W. J.: Autoantibodies to UNRP particles: relationship to clinical diagnosis and nephritis.Clin.exp.Immunol. 1991; 83:286-90.
3. Tan EM, et al.: The 1982 Revised Criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism 25: 1271-1277,1982.
4. McCarty GA. Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. Medical Clinics of North America 70: 237-261, 1986.
5. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Arth Rheum 29: 457-460, 1986.
6. Targoff IN, Reichlin M.: Measurement of antibody to Jo-1 by ELISA and comparison to enzyme inhibitory activity. J immunol 38:2874-2882, 1987.
7. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, Brennard DM and Hough D.: Antibodies to nRNP, Ro (SS-A) and La (SS-B) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. Clin Exp Immunol 62: 337- 245, 1985.

Ed. 01/2015

DCM098-5

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 SPELLLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM098-5
Ed. 01/2015

ENA Screen

for routine analysis

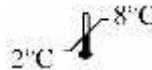
Quantitative determination of IgG class antibodies against Extractable Nuclear Antigens (ENA) in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



$\Sigma = 96$ tests

REF DKO098

INTENDED USE

Diametra ENA Screen kit is an indirect solid phase enzyme immunometric assay (ELISA) designed for the quantitative measurement of IgG class antibodies directed against extractable nuclear antigens: Sm (Smith), RNP/Sm, Scl-70, SS-A (Ro) (52kDa e 60kDa), SS-B (La), Jo-1, in human serum or plasma.

ENA Screen kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Autoimmune diseases are characterized by an abnormal functioning of the immune system which mistakenly attacks healthy body tissue. It results in a change of the mechanisms of cell recognition, the organism no longer distinguishes the "self" from "not-self", ie the elements belonging to it and those that do not. This leads to production of antibodies that can affect individual organs or trigger systemic diseases, damaging entire functions of the individual.

The processes that lead to serious autoimmune disease are still unknown in many ways.

Rheumatic autoimmune diseases are often associated with the presence of many autoantibodies directed against nuclear and cytoplasmic antigens. These antibodies are commonly called antinuclear antibodies (ANA) and their presence is important for the detection of different connective tissue diseases. Although the detection of ANA is very significant for the diagnosis of autoimmune disorders, it is not very specific. Therefore it is advisable to detect for the presence of antibodies against extractable nuclear antigens (ENA). The six most significant and investigated ENA autoantibodies are those against Sm, RNP/Sm, SS-A, SS-B, SCL-70 and Jo1. ENA Screen can provide important diagnostic informations on patients with suspected connective tissue diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), polymyositis, Sjogren syndrome, scleroderma and mixed connective tissue disease (MCTD). Every disease does not present a single parameter, but results in the simultaneous presence of multiple parameters, although there are autoantibodies that characterize a pathology better than others. For example, in Sjogren syndrome there are mainly antibodies against SS-A and SS-B, while in MCTD the most relevant antibodies are those against Sm and RNP/Sm.

2. PRINCIPLE

ENA Screen ELISA test is based on the binding of antibodies of patient serum to Sm, RNP / Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), SCL-70, Jo1 antigens coated on a microplate. The antibodies present in calibrators, controls or prediluted patient samples bind to the inner surface of the wells. After 30 minutes incubation the microplate is washed with wash buffer to remove the non-reactive serum

components. An anti-human-IgG horseradish peroxidase conjugate solution recognizes IgG class antibodies bound to the immobilized antigens. After a 30 minute incubation the excess enzyme conjugate, which is not specifically bound, is washed away with wash buffer. A chromogenic substrate solution containing TMB is dispensed into the wells. After 15 minutes of incubation the color development is stopped by adding the stop solution The solution turns yellow at this point. The level of colour is directly proportional to the concentration of IgG antibodies present in the original sample.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

- Calibrator** (1 vial, 1,2 mL)
Phosphate buffer 0.1M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$, human serum
CAL1 **REF DCE002/09806-0**
- Controls** (2 vials, 1,2 mL each, ready to use)
Phosphate buffer 0.1M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$, human serum
Negative Control **REF DCE045/09801-0**
Positive Control **REF DCE045/09802-0**
- Sample diluent** (1 vial, 100 mL)
Phosphate buffer 0.1 M $\text{NaN}_3 < 0.1\%$
REF DCE053-0
- Conjugate** (1 vial, 15 mL)
Anti h-IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP),
BSA 0.1%, Proclin $< 0.0015\%$ **REF DCE002/09802-0**
- Coated Microplate** (1 breakable microplate)
Microplate coated with ENA antigens
REF DCE002/09803-0
- TMB Substrate** (1 vial, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (avoid any skin contact)
REF DCE004-0
- Stop Solution** (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact)
REF DCE005-0
- 10X Conc. Wash Solution** (1 vial, 50 mL)
Phosphate buffer 0.2M pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reagents necessary but not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

Notes

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

Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- 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 the reagents 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, Calibrators and Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN₃) or Proclin 300^R 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. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- 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 date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic**

devices, before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.**

For this purpose, Diametra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.

- If you use automated equipment, the user has 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. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- 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 the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrator (C₁)

The Calibrator is ready to use.

Since no international reference preparation for ENA antibodies is available, the assay system is calibrated in relative arbitrary units. The concentration of the Calibrator is printed on the labels.

6.2. Preparation of the Sample

For determination of Anti-ENA antibodies, human serum or plasma are the preferred sample matrixes.

All serum and plasma samples have to be prediluted with sample diluent 1:100; for example, 10 µL of sample may be diluted with 990 µL of sample diluent.

The patients need not to be fasting, and no special sample preparation is necessary. Collect blood by venipuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation.

Samples may be stored refrigerated at 2 - 8 °C for at least 5 days. For longer storage of up to six months samples should be stored frozen at -20°C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted.

Neither Bilirubin nor Hemolysis have significant effect on the procedure.

The Controls are ready to use.

6.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (10x) with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes

respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- 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.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₁), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Calibrator C ₁	100 µL		
Controls		100 µL	
Diluted Sample		100 µL	
Incubate for 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate for 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Washing: follow the same indications of the previous point.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. RESULTS

7.1. Calibration curve

First of all determine the average of the absorbances for every duplicate. To obtain sample value, divide the absorbance of the sample for the absorbance of the Calibrator, then multiply for the concentration of the Calibrator, as shown below:

$$\text{Sample .Conc} = \frac{O.D.sample}{O.D.C1} \times \text{Conc .C1}$$

Reactivity is not connected in a linear way to the amount of antibodies present. Although an increase or a decrease in the concentration of antibodies results in increased or decreased responsiveness, the change is not in proportion (eg doubling the concentration of antibodies does not lead to a doubling of responsiveness). To achieve greater accuracy in the determination of antibodies it is recommended to test serial dilutions of the sample. The final dilution that is positive in the test is the antibody concentration of the patient.

8. REFERENCE VALUES

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with the ENA Screen tests:

	ENA Screen (AU/mL)
Negative	< 25
Positive	25

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken on an individual patient basis.

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of serum ENA.

9. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

9.1. Specificity

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 58 sera (19 of them positive sera and 39 negative sera) showed a 92.3% specificity.

9.2. Sensitivity

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 58 sera (19 positive sera and 39 negative sera) showed a 94.7% sensitivity.

9.3. Detection limit

The lowest concentration of ENA antibodies that can be distinguished from the negative control is 3.68 AU/mL with a confidence limit of 95%.

9.4. Precision and Reproducibility

9.4.1. Intra-Assay

Within run variation was determined by replicate 16 times two different sera with values in the range of the calibration curve. The within assay variability is 8.2%

9.4.2. Inter-Assay

Between run variation was determined by replicate measurements of two different control sera with different lots of kits and/or different mix of lots of reagents. The between assay variability is 11.2%.

10. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Antinuclear antibody The Lancet, September 15,1984:611-13
2. Reichlin,M., Van Venrooij, W. J.: Autoantibodies to UNRP particles: relationship to clinical diagnosis and nephritis.Clin.exp.Immunol. 1991; 83:286-90.
3. Tan EM, et al.: The 1982 Revised Criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism 25: 1271-1277,1982.
4. McCarty GA. Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. Medical Clinics of North America 70: 237-261, 1986.
5. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Arth Rheum 29: 457-460, 1986.
6. Targoff IN, Reichlin M.: Measurement of antibody to Jo-1 by ELISA and comparison to enzyme inhibitory activity. J immunol 38:2874-2882, 1987.
7. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, Brennard DM and Hough D.: Antibodies to nRNP, Ro (SS-A) and La (SS-B) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. Clin Exp Immunol 62: 337- 245, 1985.

Ed. 01/2015

DCM098-5

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



DCM098-5
Ed. 01/2015

ENA Screen

para análisis de rutina

Determinación cuantitativa de los anticuerpos IgG contra los antígenos nucleares extraíbles en suero o plasma humano.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO098

USO PREVISTO

El kit ENA Screen es un ensayo inmunoenzimático indirecto en fase sólida (ELISA) desarrollado para la determinación semicuantitativa de los anticuerpos de clase IgG directos contra: Sm (Smith), RNP/Sm, Scl-70, SS-A (Ro) (52 kDa y 60 kDa), SS-B (La), Jo-1, presentes en el suero o plasma humano.

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

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

Las patologías autoinmunes se caracterizan por un funcionamiento anormal del sistema inmunitario, que agrede al propio organismo. Se produce una modificación de los mecanismos de reconocimiento celular, que ya no permiten al organismo distinguir entre los elementos que le pertenecen y los elementos extraños. Esto lleva a una producción de anticuerpos que pueden afectar a órganos específicos o desencadenar enfermedades sistémicas, dañando funciones completas del individuo. Los procesos que llevan a la aparición de las patologías autoinmunes son todavía desconocidos por muchos aspectos.

Las patologías reumáticas autoinmunes suelen asociarse a la presencia de muchos autoanticuerpos directos contra antígenos nucleares y citoplasmáticos. Estos anticuerpos se denominan comúnmente anticuerpos anti núcleo (ANA) y su presencia es importante para diagnosticar distintas patologías del tejido conectivo. Aunque la investigación de ANA es muy significativa en términos de diagnóstico, resulta poco específica; por este motivo, se elige detectar la presencia de anticuerpos contra los antígenos nucleares extraíbles (ENA). Los seis autoanticuerpos anti ENA más significativos y más investigados son aquellos contra Sm, RNP/Sm, SS-A, SS-B, Scl-70 y Jo-1. El cribado ENA puede proporcionar información de diagnóstico importante sobre pacientes con sospecha de enfermedades del tejido conectivo, como: lupus eritematoso sistémico (LES), polimiositis, síndrome de Sjögren, esclerodermia y enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD). Cada patología no presenta un solo parámetro específico, sino que presenta simultáneamente varios parámetros, incluso cuando están presentes los autoanticuerpos que caracterizan la patología más que otros. Por ejemplo, en el síndrome de Sjögren se encuentran principalmente anticuerpos contra SS-A y SS-B, mientras que en la MCTD, los más importantes son aquellos contra Sm y RNP/Sm.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo ENA Screen se basa en la unión de los anticuerpos presentes en suero con los antígenos Sm, RNP/Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Scl-70, Jo-1 absorbidos en la microplaca. Los anticuerpos presentes en los

calibradores, en los controles o en las muestras prediluidas de los pacientes se unen a la superficie interna de los pocillos. Tras 30 minutos de incubación, la microplaca se lava con un tampón de lavado para retirar los componentes del suero que no han reaccionado. Una solución de inmunoglobulinas anti-IgG humana conjugadas con peroxidasa reconoce los anticuerpos de clase IgG unidos a los antígenos inmovilizados. Tras 30 minutos de incubación, el exceso de conjugado enzimático que no se ha unido específicamente se retira mediante el tampón de lavado. Se añade a los pocillos una solución de sustrato cromogénico que contiene TMB. Tras 15 minutos de incubación se bloquea el desarrollo del color mediante la adición de la solución de parada. El color de la solución se vuelve amarillo. La cantidad del color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos IgG presentes en la muestra original.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

- Calibradores** (1 frasco, 1,2 mL)
Tampón fosfato 0,1 M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$, suero humano CAL1 **REF DCE002/09806-0**
- Controles** (2 frascos, 1,2 mL cada uno, listo para usar)
Tampón fosfato 0,1 M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$, suero humano
Control negativo **REF DCE045/09801-0**
Control positivo **REF DCE045/09802-0**
- Diluyente de muestra** (1 frasco, 100 mL)
Tampón fosfato 0,1 M $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ **REF DCE053-0**
- Conjugado** (1 frasco, 15 mL)
Anti h-IgG conjugado con peroxidasa de rabano (HRP), BSA 0,1%, Proclin $< 0,0015\%$ **REF DCE002/09802-0**
- Microplaca recubierta**
(1 microplaca rompible con antígenos ENA absorbidos) **REF DCE002/09803-0**
- Substrato TMB** (1 frasco, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel) **REF DCE004-0**
- Solución de parada** (1 frasco, 15 mL)
Ácido sulfúrico 0,15M (evitar el contacto con la piel) **REF DCE005-0**
- Solución de lavado conc.10X** (1 frasco, 50 mL)
Tampón fosfato 0,2M pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

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

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierto, se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.

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 Calibradores y de los controles 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 positivo y negativo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN_3) o Proclin 300^R 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.
- **ATENCIÓN: se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa adecuadamente, podría contaminarse por agentes externos;** se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad necesaria exacta de conjugando y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática,** se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la flúidica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteinización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; **este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso.** Para tal fin, Diametra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.
- 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 mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- 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 los Calibradores

El Calibración está listo para el uso.

Puesto que no hay disponibles preparados de referencia internacional para los anticuerpos anti ENA, el sistema de medición se calibra en unidades relativas arbitrarias. El valor de la concentración del Calibración se indica en las etiquetas.

6.2. Preparación de la muestra

Las matrices preferidas para la determinación de los anticuerpos anti ENA son suero o plasma humano. **Todas las muestras de suero o plasma deben prediluirse 1:100 con diluyente de muestras**; por ejemplo, 10 µL de muestra pueden diluirse con 990 µL de diluyente de muestras.

Los pacientes no deben necesariamente estar en ayunas y no se requiere ninguna preparación especial. Recoger la sangre mediante extracción venosa en un Vacutainer y separar el suero (tras la formación del coágulo) o el plasma de las células mediante centrifugado.

Las muestras pueden conservarse refrigeradas a 2-8°C durante al menos 5 días. Para períodos de conservación más largos, hasta 6 meses, las muestras deberán congelarse a -20°C. Para evitar congelaciones y descongelaciones repetidas, las muestras deberían dividirse en alícuotas. La hemólisis y la presencia de bilirrubina no tienen efectos evidentes en la determinación. Los controles son listo para usar.

6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada frasco de solución de lavado tamponada concentrada (10X) con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8 °C durante al menos 30 días.

En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- 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.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₁), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ controles	Blanco
Calibrador C ₁	100 µL		
Controles		100 µL	
Muestra diluida		100 µL	
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Lavados: siga las mismas instrucciones del punto anterior.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (22-28°C).			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

8. RESULTADOS

8.1. Cálculo de los resultados

En primer lugar, hay que determinar la media de las absorbancias para cada set de duplicados. Para obtener el valor de la muestra se debe dividir el valor de la absorbancia de la muestra por el valor de la absorbancia del Calibración y multiplicarlo por el valor en AU del Calibración, indicado en la etiqueta, según la siguiente fórmula:

$$Sample .Conc = \frac{O.D. sample}{O.D.S1} \times Conc .S1$$

La reactividad no está relacionada de forma lineal con la cantidad de anticuerpos presentes. De hecho, a pesar de que un aumento o una disminución de la concentración de anticuerpos resulte en un aumento o una disminución de la reactividad, la variación no es proporcional (por ejemplo, la duplicación de la concentración de anticuerpos no lleva necesariamente a la duplicación de la reactividad). Para obtener mayor precisión en la determinación del contenido de anticuerpos se recomienda comprobar diluciones en serie de la muestra. La última dilución que resulta positiva en el ensayo representa la concentración de anticuerpos del paciente.

9. VALORES DE REFERENCIA

En un estudio sobre los valores normales realizado con muestras de suero procedentes de donantes sanos se han determinado los siguientes intervalos de normalidad con el ensayo ENA Screen:

	ENA Screen (AU/mL)
Negativo	< 25
Positivo	25

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

Los resultados positivos deben verificarse con relación al estado clínico del paciente. Además, cada decisión relativa a la terapia debe tomarse individualmente. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos normal y patológico de anti ENA sérico.

9.1. Especificidad

Ensayos de correlación frente a un kit similar de referencia disponible en el mercado, realizados con 58 sueros (19 positivos y 39 negativos) han mostrado una especificidad del 92,3%.

9.2. Sensibilidad

Ensayos de correlación frente a un kit similar de referencia disponible en el mercado, realizados con 58 sueros (19 positivos y 39 negativos) han mostrado una sensibilidad del 94,7%.

9.3. Límite de detección

La concentración mínima de anticuerpos anti ENA que puede distinguirse del Control negativo es de 3,68 AU/mL con un límite de confianza del 95%.

9.4. Precision

9.4.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando 16 veces la medición de dos sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es 8.2%.

9.4.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando la medición de dos sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 11.2%.

10. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Antinuclear antibody The Lancet, September 15,1984:611-13
2. Reichlin,M., Van Venrooij, W. J.: Autoantibodies to UNRP particles: relationship to clinical diagnosis and nephritis.Clin.exp.Immunol. 1991; 83:286-90.
3. Tan EM, et al.: The 1982 Revised Criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism 25: 1271-1277,1982.
4. McCarty GA. Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. Medical Clinics of North America 70: 237-261, 1986.

5. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Arth Rheum 29: 457-460, 1986.
6. Targoff IN, Reichlin M.: Measurement of antibody to Jo-1 by ELISA and comparison to enzyme inhibitory activity. J immunol 38:2874-2882, 1987.
7. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, Brennard DM and Hough D.: Antibodies to nRNP, Ro (SS-A) and La (SS-B) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. Clin Exp Immunol 62: 337- 245, 1985.

Ed. 01/2015

DCM098-5

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

	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 Establa 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	LOT	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	CONT	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 Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	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

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