DIESSE

INSTRUCCIONES DE USO

CHORUS
ANA-Screen

Para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG anti-células HEp2

Sólo para el uso diagnóstico *in vitro*

1. INDICACIONES

Método inmunoenzimático para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG anti-células HEp2 en suero humano con dispositivo desechable aplicado a los equipos Chorus y Chorus TRIO.

2. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos anti-nucleares (ANA) están dirigidos contra una variedad de antígenos nucleares y citoplasmáticos, y se dan en elevada frecuencia en enfermedades reumáticas sistémicas. Por lo tanto, su detección representa una herramienta importante para el diagnóstico diferencial. Por ejemplo, los anticuerpos SS-A (Ro) y SS-B (La) están asociados con el LES y el síndrome de Sjogren, los anticuerpos anti-dsDNA y anti-Sm con el LES, los anticuerpos anti-histona con el LES y el lupus eritematosus inducidos por drogas, los anticuerpos anti-RNP con la enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD) y el LES, los anticuerpos anti-Scl-70 con el escleroderma (esclerosis sistémica progresiva [PSS]), los anticuerpos anti-Jo-1 con la polimiositis y la dermatomiositis y los anticuerpos anti-centrómero con el síndrome de CREST.
El test de inmunofluorecencia indirecta IFI en células eucariotas como HeLa e HEp2 ha sido el método establecido para la detección de los ANA. Aunque el IFI es un test sensibile, es laborioso cuando se analiza un gran número de muestras de pacientes y está sujeto a errores de interpretación humana y de variabilidad en cuanto al microscopio de fluorescencia. El test es una excelente alternativa al IFI en cuanto al cribaje del suero del paciente en busca de la presencia de ANAs de importancia clínica. Las especificidades particulares de los anticuerpos deben ser determinadas a través de un análisis más específico y utilizando ELISAs que emplean antígenos diana específicos, consiguiéndose una diferenciación de los ANAs sencilla y fiable.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El dispositivo Chorus ANA-Screen está listo para su uso para la detección de anticuerpos IgG anti- antígenos nucleares, en los equipos Chorus/Chorus TRIO.
El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Células HEp2 lisadas están unidos a la fase sólida. Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.
Después de varios lavados para eliminar las proteínas que no hayan reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas conjugadas con peroxidasa de rábano.
El conjugado que no se ha unido se elimina y se añade el sustrato cromogénico de la peroxidasa. El color que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.
Los dispositivos desechables contienen todos los reactivos para realizar la prueba cuando se utilizan con los equipos Chorus/Chorus TRIO.
El resultado se expresa en Index (relación entre el valor en D.O. de la muestra y lo del Cut-Off) calculadas con referencia a CDC Atlanta.

4. PRECAUCIONES

PARA USO EXCLUSIVO EN DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y han dado resultados negativos en métodos aprobados por la FDA para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una garantía completa sobre la ausencia de agentes infecciosos, cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las normas comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

Desecho de los residuos: las muestras de suero, los calibradores y las tiras utilizadas se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, de acuerdo con las disposiciones normativas vigentes.

Advertencias para la seguridad personal

1. No pipetear por vía oral.
2. Usar guantes desechables y protección para los ojos al manipular las muestras.
3. Lavarse bien las manos una vez introducidos los dispositivos en el instrumento Chorus/Chorus TRIO.
4. Sobre las características de seguridad de los reactivos contenidos en el kit, consultar la Ficha de Seguridad (disponible bajo solicitud).
5. Los ácidos neutralizados y otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1.0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada debe ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1%, antes de continuar con el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes

de que se limpie la zona. Todos los materiales utilizados para limpiar vertidos, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

Poner los dispositivos a utilizar a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso; utilizar en 60 minutos.

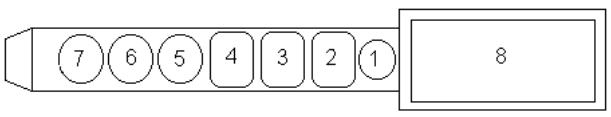
1. **Desechar los dispositivos con sustrato (pocillo 4) de color azul.**
2. Añadiendo la muestra al pocillo, comprobar que esté bien distribuida en el hondo.
3. Comprobar la presencia de los reactivos en el dispositivo y que éste no esté dañado. No utilizar dispositivos que, en el control visual, presenten falta de algún reactivo y/o cuerpos extraños en el pocillo de reacción.
4. Los dispositivos se deben utilizar junto con el equipo Chorus/Chorus TRIO, siguiendo rigurosamente las Instrucciones de Uso y el Manual del Usuario del equipo.
5. Comprobar que las opciones del equipo Chorus/Chorus TRIO sean correctas (ver Manual del Usuario).
6. No modificar el código de barras colocado en el asa del dispositivo a fin de garantizar la lectura correcta.
7. Evitar el uso de congeladores autodescongelantes para la conservación de las muestras.
8. Los códigos de barras dañados se pueden colocar en el equipo manualmente (ver Manual del Usuario).
9. No exponer los dispositivos a luz intensa ni a humos de hipoclorito durante su conservación y/o uso.
10. El uso de muestras altamente hemolizadas, lipémicas, ictéricas, de suero no coagulado completamente o de muestras que presenten contaminación microbiana puede ser fuente de error.
11. No utilizar el dispositivo después de la fecha de caducidad.
12. **Comprobar que el aparato esté conectado con la Washing Buffer Autoimmunity (Ref. 86004).**

5. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Reactivos suficientes para 36 determinaciones (REF 86014)
Reactivos suficientes para 12 determinaciones (REF 86014/12)

DD DISPOSITIVOS
6 envases con 6 dispositivos cada uno (REF 86014)
2 envases con 6 dispositivos cada uno (REF 86014/12)

Descripción:



Posición 8: Espacio para etiquetas con código de barras
Posición 7: libre
Posición 6: POCILLO DE MICROPLACA
Sensibilizado con células HEp2 lisadas y antígenos elevadamente purificados (dsDNA, SSA, SSB, SCL-70, Jo-1, Ribosomal P, Centromere B)
Posición 5: POCILLO DE MICROPLACA
No sensibilizado.
Posición 4: SUSTRATO TMB
Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H_2O_2 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3.8)
Posición 3: DILUYENTE PARA MUESTRAS
Contenido: solución proteica salina con Proclin (0.1%)
Posición 2: CONJUGADO
Contenido: anticuerpos monoclonales anti-IgG humanos marcados con peroxidasa, en una solución tampón fosfato con fenol al 0.05% y Bronidox al 0.02%.
Posición 1: POCILLO LIBRE
Donde el usuario dispensa el suero sin diluir.

Uso: equilibrar un envase a temperatura ambiente, abrir el envase y retirar los dispositivos necesarios; colocar los dispositivos no utilizados en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y **cerrar** presionando el cierre. Conservar a 2/8°C.

CALIBRATOR CALIBRADOR **1 x 0.175 ml**
Contenido: Suero humano diluido que contiene anticuerpos IgG anti-células HEp2 y conservante. Líquido, listo para su uso.

CONTROL + CONTROL POSITIVO **1 x 0.425 ml**
Contenido: Suero humano diluido que contiene anticuerpos IgG anti-células HEp2 y conservante. Líquido, listo para su uso.

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS:

- WASHING BUFFER AUTOIMMUNITY REF 86004
- CLEANING SOLUTION 2000 REF 83609
- SANITIZING SOLUTION REF 83604 – 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT REF 83607
- Equipo Chorus/Chorus TRIO
- Agua destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 50-200 µl
- Guantes desechables
- Solución de hipoclorito de sodio (5%)
- Envases para la recogida de materiales potencialmente Infecciosos

6. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. En caso de una errónea temperatura de conservación, la calibración debe ser repetida y la validez del resultado debe ser verificada por medio del suero de control (ver capítulo 9, "Validación de la prueba").

La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja.
Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la apertura y/o preparación.

DISPOSITIVOS	8 semanas a 2/8°C
CALIBRADOR	8 semanas a 2/8°C
CONTROL POSITIVO	8 semanas a 2/8°C

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

La muestra consta de suero extraído de la vena de forma común y debe manipularse siguiendo las precauciones dictadas por la buena práctica de laboratorio.
No se conocen las consecuencias del uso de otros líquidos biológicos.
El suero fresco se puede conservar a 2/8°C durante 4 días; para conservaciones más largas congelar a –20ºC.
La muestra se puede descongelar hasta un máximo de 3 veces.
No deben ser utilizados congeladores autodescongelantes para la conservación de la muestra. Después de descongelar, agitar con cuidado antes de su uso.
La inactivación por calor puede dar resultados erróneos.
La calidad de la muestra puede verse seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.

8. PROCEDIMIENTO

1. Abrir el envase (por el lado del cierre a presión), retirar los dispositivos necesarios para ejecutar las pruebas y conservar los demás en el envase, extraer el aire y cerrar presionando el cierre.
2. Comprobar visualmente el estado del dispositivo según las indicaciones del capítulo 4, “Precauciones”.
3. Dispensar 50 µl de suero no diluido en el pocillo n°1 de cada dispositivo. Por cada cambio de lote utilizar un dispositivo para el calibrador.
4. Colocar los dispositivos en el equipo Chorus/Chorus TRIO. Ejecutar la calibración (si fuera necesario) y el test según indicaciones del Manual del Usuario del equipo.

9. VALIDACIÓN DE LA PRUEBA

Utilizar el suero de control para verificar la validez del resultado obtenido, procesándolo según indicaciones del Manual del Usuario del equipo. Si el equipo indica que el suero de control tiene un valor fuera de los límites de aceptabilidad, es necesario realizar de nuevo la calibración. Los resultados previos se corregirán automáticamente.
Si el resultado del suero de control continúa estando fuera del rango de aceptabilidad, contactar con Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El equipo Chorus/Chorus TRIO proporciona un resultado en Index (relación entre el valor en D.O. de la muestra y el del Cut-Off).

La prueba del suero examinado puede ser interpretada de la manera siguiente:

POSITIVO cuando el resultado es > 1.2
NEGATIVO cuando el resultado es < 0.8
DUDOSO/EQUÍVOCO cuando el resultado está entre 0.8 y 1.2

En caso de un resultado dudoso/equívoco se aconseja repetir la prueba. Si el resultado continúa siendo dudoso/equívoco, tomar una nueva muestra.

11. LIMITACIONES

Todos los valores obtenidos precisan una atenta interpretación que no prescinda de otros indicadores relativos al mismo paciente.
Este test, de hecho, no debe ser la única prueba utilizada para el diagnóstico clínico. El resultado de la prueba se debe evaluar junto con los datos clínicos y otros procedimientos de diagnóstico.

12. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

5 muestras (2 Negativas, 1 de Cut-Off y 2 Positivas) fueron analizadas a las cuales se añadieron los interferentes siguientes:

Factor reumatoide (44-220 IU/ml)
Bilirrubina (4.5 mg/dl – 45 mg/dl)
Triglicéridos (10 mg/dl - 250 mg/dl)
Hemoglobina (5 mg/ml - 30 mg/ml)

La presencia en el suero de las sustancias interferentes antes mencionadas no afecta el resultado del test.

13. REACCIONES CRUZADAS

33 muestras, positivas en dsDNA, SS-A, SS-B, Sm, Scl-70, Jo-1, U1-RNP, U3-RNP, Centromere Pattern FANA, PM1, rRNP/Ribosomal P, MPO-ANCA, PR3-ANCA, Gliadina A, Gliadin G, Transglutaminasa IgA, Cardiolipin IgG, Cardiolipin IgM, β-2-Glycoprotein IgG, β-2-Glycoprotein IgM, Anti-Tg y Anti-TPO fueron testadas.
No se detectaron reacciones cruzadas significativas.

14. ESTUDIOS DE COMPARACIÓN

En una prueba, se analizaron 444 muestras con el kit Diesse y con otro kit comercial.
A continuación se muestran los datos de la prueba:

		Referencia		
		+	-	Total
Diesse	+	146	15	161
	-	18	265	283
	Total	164	280	444

Percent Positive Agreement (~Sensibilidad de Diagnóstico):
89.0% $CI_{95\%}$: 83.3- 92.9
Percent Negative Agreement: (~Especificidad de Diagnóstico):
94.6% $CI_{95\%}$: 91.3- 96.7

El grado de concordancia entre los dos métodos resulta excelente y, con un valor de K (constante de Cohen) de 0.85.

15. PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD

Muestra	INTRA-ENSAYO		ENTRE ENSAYOS	
	Media Index	CV%	Media Index	CV%
1	0.4	10.0	0.5	10.0
2	0.5	8.0	0.6	8.3
3	0.7	8.6	0.8	5.0
4	0.7	7.1	0.6	6.7
5	0.9	8.9	1.0	7.0
6	0.9	7.8	0.8	8.8
7	1.1	7.3	1.2	6.7
8	1.2	8.3	1.2	5.8
9	2.4	7.5	2.5	8.0
10	3.6	4.7	3.7	7.8
11	4.8	6.9	4.8	6.5
12	5.8	5.3	5.9	4.7

Muestra	ENTRE LOTES		ENTRE EQUIPOS	
	Media Index	CV%	Media Index	CV%
1	0.5	-	0.5	-
2	0.6	-	0.6	-
3	0.7	8.6	0.7	-
4	0.6	-	0.6	-
5	0.9	-	0.9	-
6	0.9	6.7	0.9	-
7	1.1	-	1.1	-
8	1.1	-	1.1	-
9	2.5	2.4	2.5	-
10	3.7	1.6	3.7	1.6
11	4.8	3.1	4.8	1.3
12	6.1	2.8	6.1	1.0

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Peter J.B., Shoenfeld Y (1996) Sciences B.V., Amsterdam.
2. Froelich C.H., Wallmann H., Skosey J.I., Teodorescu M. (1990) J. Rheumatology 17: 192.
3. Mierau R., Genth E. (1998). In: Thomas L. Labor und Diagnose. TH-Books, Frankfurt, 15. Auflage: 843-851.
4. Schmolke M., Oppermann M., Helmke K., Guder WG (2000) Poster P59, 5th Dresden Symposium on Autoantibodies.
5. Tan EM (1989). Adv. Immunol. 44: 93-151.

DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy

CE

DIESSE

INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION

CHORUS
ANA-Screen

Pour la détermination qualitative des anticorps IgG anti-cellules HEp2

Uniquement pour diagnostic *in vitro*.

1. UTILISATION

Méthode immunoenzymatique pour la détermination qualitative des anticorps de classe IgG anti-cellules HEp2 dans le sérum humain en utilisant un dispositif à usage unique appliqué aux appareils Chorus et Chorus TRIO.

2. INTRODUCTION

Les anticorps anti-nucléaires (ANA) sont dirigés contre de nombreux antigènes nucléaires et cytoplasmiques et se rencontrent très fréquemment dans les maladies systémiques rhumatoïdes. Leur détermination représente donc un instrument fondamental pour le diagnostique différentiel. Par exemple, les anticorps SS-A (Ro) et SS-B (La) sont associés au SLE et au syndrome de Sjogren, les anticorps anti-dsDNA et anti-Sm au SLE, les anticorps anti-histone au SLE et au lupus érythémateux provoqués par des médicaments, les anticorps anti-RNP aux maladies mixtes du tissu conjonctif (MCTD) et au SLE, les anticorps anti-Scl-70 à la sclérodermie (sclérose systémique progressive (PSS), les anticorps anti-Jo-1 à la polymyosite et à la dermatomyosite, les anticorps anti-protéines centromériques au syndrome de CREST.
Pour la détermination des ANA, la méthode choisie jusqu'aujourd'hui a été le test indirect par immunofluorescence (IFT) sur les cellules eucaryotiques, par ex. les cellules HeLa et HEp2. Bien que celle-ci soit une méthode sensible, elle est laborieuse en cas de sérums nombreux et peut être en outre sujette à des erreurs liées à l'interprétation des résultats de la part du personnel de laboratoire et à la variabilité des microscopes à fluorescence. Le test est en outre une excellente alternative au test par immunofluorescence pour la détermination des ANA cliniquement importants dans les sérums des patients. Les spécificités de chaque anticorps doit être déterminée avec des tests plus spécifiques en utilisant des méthodes ELISA qui utilisent les antigènes-cible spécifiques pour une différenciation simple et soignée des ANA.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le dispositif Chorus ANA-Screen est prêt à l'usage pour la détermination des anticorps IgG anti-antigènes nucléaires, dans les appareils Chorus/Chorus TRIO.

Le test se base sur le principe ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Cellules HEp2 lysées sont liés à la phase solide. En le faisant incuber avec du sérum humain dilué, les immunoglobulines spécifiques se lient à l'antigène. Après lavage pour éliminer les protéines qui n'ont pas réagi, on effectue l'incubation avec le conjugué constitué d'anticorps anti-immunoglobulines humaines conjuguées avec du peroxyde de raifort.
Le conjugué non lié est éliminé et le substrat de la peroxydase est ajouté.
La couleur qui se développe est proportionnelle à la concentration des anticorps spécifiques présents dans le sérum en examen.
Les dispositifs à usage unique contiennent tous les réactifs pour réaliser le test lorsqu'ils sont appliqués aux appareils Chorus/Chorus TRIO.
Le résultat est exprimé en Indice – rapport entre la valeur en OD de l'échantillon et celle du Cut-Off calculées en référence à CDC Atlanta.

4. PRÉCAUTIONS

UNIQUEMENT POUR DIAGNOSTIC *IN VITRO*.

Ce coffret contient des matériaux d'origine humaine qui ont été contrôlés et trouvés négatifs à la suite de l'exécution de tests approuvés par la FDA, tant pour la recherche de HBsAg que pour la recherche des anticorps anti-VIH-1/VIH-2 et anti-VHC. Étant donné qu'aucun test diagnostic ne peut offrir une garantie absolue quant à l'absence d'agents infectieux, tout matériau d'origine humaine doit être considéré comme étant potentiellement infecté. Tous les réactifs et échantillons doivent être maniés conformément aux normes de sécurité normalement adoptées par les laboratoires.

Mise au rebut des résidus : les échantillons de sérum, les calibrateurs et les barrettes utilisés doivent être traités comme des résidus infectés. Ils doivent donc être éliminés conformément aux réglementations légales en vigueur.

Avertissements pour la sécurité personnelle

7. Ne pas pipeter avec la bouche.
8. Utiliser des gants à jeter et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.
9. Se laver soigneusement les mains après avoir inséré les dispositifs dans l'appareil Chorus/Chorus TRIO.
10. En ce qui concerne les caractéristiques de sécurité des réactifs contenus dans le coffret, se référer aux Fiches de Données de Sécurité (disponibles sur demande).
11. Les acides neutralisés et les déchets liquides doivent être décontaminés avec un volume suffisant de solution d'hypochlorite de sodium pour que la concentration finale soit de 1 % minimum. Une exposition à l'hypochlorite de sodium à une concentration de 1 % pendant 30 minutes devrait suffire pour garantir une décontamination efficace.
12. En cas de renversement accidentel de matériaux potentiellement infectés, essuyer immédiatement avec du