

AESKULISA[®]

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA ENA-6Pro

Ref 3103





Product Ref.	3103
Product Desc.	ENA-6Pro
Manual Rev. No.	003 : 2015-06-15

Manual de Instrucciones

Contenido

1	Utilización	1
2	Aplicación clínica y principio del ensayo	1
3	Contenido del equipo	2
4	Almacenamiento y Caducidad	2
5	Precauciones	3
6	Toma, manipulación y almacenamiento de las muestras	4
7	Procedimiento del ensayo	4
8	Interpretación cualitativo y semicuantitativa	7
9	Datos Técnicos	8
10	Datos de funcionamiento	8
11	Bibliografía	9





Product Ref.	3103
Product Desc.	ENA-6Pro
Manual Rev. No.	003 : 2015-06-15

1 Utilización

AESKULISA ENA-6Pro es un enzimoimmunoensayo en fase sólida para la detección semicuantitativa y separada de anticuerpos IgG contra seis antígenos celulares y nucleares en suero humano. Los pocillos están revestidos con SS-B, SS-A 52 kDa, Scl 70, Jo-1 recombinantes y snRNP/Sm, Sm y SS-A 60 kDa humanos nativos y elevadamente purificados. El ensayo es una herramienta para el diagnóstico diferencial de las enfermedades reumáticas sistémicas.

2 Aplicación clínica y principio del ensayo

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son una herramienta importante para el diagnóstico diferencial de las enfermedades reumáticas sistémicas. El test de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células eucariotas como HeLa ha sido el método establecido para la detección de los ANA. Las especificidades de los anticuerpos en particular se distinguen a través de patrones de fluorescencia pero también está disponible un análisis más específico a través de ELISAs que emplean los antígenos diana consiguiendo así una diferenciación de los ANA sencilla y fiable.

Los ANA se encuentran especialmente en el lupus eritematoso sistémico (LES) activo e inactivo, en la enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD), escleroderma, síndrome de Sjögren, polimiositis.

Los ANA contra:

- Sm (antígeno Smith) se dirigen contra las proteínas del núcleo (B, B', D1-D3, E, F, G) de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs). Los anti-Sm así como los anticuerpos contra el DNA de doble cadena (dsDNA) son elevadamente específicos para el LES y de este modo se incluyen en los criterios de diagnóstico y clasificación del LES.
- el complejo snRNP/Sm se dirigen contra Sm y las proteínas de U1 snRNP (70 kDa, A y C). Se dan en el LES, síndrome de Sjögren, escleroderma y polimiositis.
- SS-A (Ro; ribonucleoproteínas solubles citoplasmáticas y/o nucleares de 52 kDa y 60 kDa) y anticuerpos contra SS-B (La; proteína de 48 kDa asociada con la RNA polimerasa III) se encuentran principalmente en títulos altos del síndrome de Sjögren primario y secundario pero también en el LES, bloqueo congénito y lupus neonatal.
- Scl-70 se dirigen contra la DNA-topoisomerasa I. Son elevadamente específicos para el escleroderma sistémico y dan un indicio para un curso grave.
- Jo-1 se dirigen contra la histidil-tRNA sintetasa (proteína citoplasmática relacionada con la biosíntesis de proteínas) y se encuentran en el 20-40 % de pacientes con polimiositis y dermatomiositis.

Principio del test

Las muestras de suero diluidas 1:101 se incuban en la microplaca revestida con el antígeno específico. Los anticuerpos de los pacientes, si están presentes en la muestra, se unen al antígeno. La fracción no unida es eliminada por el lavado en el paso siguiente. Después, las inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa (conjugado) se incuban y reaccionan con el complejo antígeno-anticuerpo de las muestras dentro de la microplaca. El conjugado no unido es retirado a través del lavado en el paso siguiente. La adición del substrato-TMB genera una reacción colorimétrica (azul) enzimática que se detiene a través de ácido diluido (el color cambia a amarillo). La intensidad de formación de color a partir del cromógeno depende de la cantidad de conjugado unido al complejo antígeno-anticuerpo y es proporcional a la concentración inicial de los respectivos anticuerpos en la muestra del paciente.

3 Contenido del equipo

PARA SER RECONSTITUIDO				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Tampón de muestra (5x)	1 x 20 ml	Blanco	Amarillo	Concentrado 5 x Tris, Cloruro de sodio (NaCl), albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Tampón de lavado (50x)	1 x 20 ml	Blanco	Verde	Concentrado 50 x Tris, Cloruro de sodio (NaCl), Tween 20, azida sódica < 0,1 % (conservante)
LISTO PARA EL USO				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Calibradores A-D	4 x 1,5 ml	Verde	Amarillo*	cada uno : 0, 10, 30, 100 U/ml. Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Calibrador cut-off	1 x 1,5 ml	Azul	Amarillo	Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Conjugado, IgG	1 x 15 ml	Azul	Azul	Inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa de rábano picante, albúmina de suero bovino (BSA)
Substrato TMB	1 x 15 ml	Negro	Incoloro	Terametilbenzidina estabilizada y peróxido de hidrógeno (TMB/H ₂ O ₂)
Solución de paro	1 x 15 ml	Blanco	Incoloro	Ácido clorhídrico 1M
Placa Microtiter	12 x 8 tiras de pocillos	N/D	N/D	Con tiras rompibles de pocillos. Consulte el párrafo 1 para obtener información sobre revestimiento.
* La intensidad del color aumenta con la concentración				
MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO				
Filtro de lectura de 450 nm para lector de tiras Microtiter y filtro de referencia recomendado de 620 nm (600-690 nm). Equipo de cristal (cilindro 100-1000 ml), tubos de ensayo para disoluciones. Mezclador espiral, pipetas de precisión (10, 100, 200, 500, 1000 µl) o pipeta múltiple ajustable (100-1000 µl). Dispositivo de lavado de la microplaca (pipeta de repetición o microcanal de 300 µl o sistema automatizado), papel absorbente. Nuestras pruebas se han diseñado para uso con agua destilada, de acuerdo con la definición de las farmacopeas de Estados Unidos (USP 26 - NF 21) y Europa (Eur.Ph. 4ª ed.).				

4 Almacenamiento y Caducidad

Guarde todos los reactivos y la microplaca a 2-8°C/35-46°F, en sus envases originales. Una vez preparadas, las soluciones reconstituidas son estables durante 1 mes a 2-8°C/35-46°F. Los reactivos y la microplaca deben ser utilizados solamente dentro del margen de caducidad indicado en cada componente. Evite la exposición de la solución TMB a la luz intensa. Guarde las microplacas en su sobre correspondiente, incluyendo el desecante, y sellelo bien.



Product Ref.	3103
Product Desc.	ENA-6Pro
Manual Rev. No.	003 : 2015-06-15

5 Precauciones

5.1 Datos de riesgo para la salud

ESTE PRODUCTO ES SOLO PARA EL USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO . Por lo tanto, solamente el personal formado y especialmente asesorado en los métodos de diagnóstico in vitro puede realizar el ensayo. Aunque este producto no se considera especialmente tóxico ni peligroso en las condiciones de uso previsto, siga estas recomendaciones para garantizar un nivel de seguridad óptimo:

Recomendaciones y precauciones

Este equipo contiene componentes potencialmente peligrosos. Aunque los reactivos del equipo no están clasificados como irritantes de los ojos y la piel, recomendamos evitar el contacto de los mismos con los ojos y con la piel y utilizar guantes desechables.

¡AVISO! Los calibradores, controles y agentes contienen ázida de sodio (NaN_3) como conservante. El NaN_3 puede ser tóxico si se ingiere o se absorbe por medio de la piel o de los ojos. El NaN_3 puede reaccionar con la fontanería de plomo y de cobre y formar ázida metálica muy explosiva. Al tirar tirarla, deje correr una gran cantidad de agua para evitar que la ázida tome consistencia. Por favor, consulte los procesos de descontaminación del CDC u otras directrices locales o nacionales.

No fume, coma o beba mientras manipule el equipo. No pipetee con la boca.

Todo el material de fuente humana utilizado en algunos reactivos de este equipo (por ejemplo controles, standards) ha sido analizado a través de métodos aprobados y ha resultado ser negativo para HbsAg, Hepatitis C y HIV 1. No obstante, ningún test puede completamente garantizar la ausencia de agentes virales en ese tipo de material. Por lo tanto, manipule los controles, standards y muestras de los pacientes como si se trataran de auténticos transmisores de enfermedades infecciosas y según los requerimientos de manipulación de su país.

Como se indica en la sección Contenido del equipo, el equipo contiene material de origen animal que debe manipularse de acuerdo con la normativa nacional.

5.2 Instrucciones generales para la utilización

En caso de que observe defectos o datos incorrectos en la información del producto, incluidas las etiquetas, póngase en contacto con el fabricante o proveedor del producto.

No mezcle o sustituya Control, Calibradores, Conjugado o microplacas de números de lote diferentes. Esto podría llevar a una variación de los resultados.

Deje que todos los componentes alcancen la temperatura (20-32°C/68-89,6°F) antes de utilizarlos. Agítelos bien y siga el esquema de incubación recomendado para una óptima realización del ensayo.

Incubación: Se recomienda realizar las pruebas a 30°C/86°F para sistemas automatizados.

No exponga nunca los componentes a temperaturas más altas de 37°C/ 98,6 °F.

Pipetee siempre la solución de substrato con puntas nuevas. Protega este reactivo de la luz. Nunca pipetee el conjugado con puntas previamente utilizadas con otros reactivos.

Un diagnóstico clínico definitivo no debe estar basado solamente en los resultados del ensayo realizado. Debe ser elaborado por el médico después de haber evaluado todos los hallazgos clínicos y de laboratorio. Es necesario verificar el diagnóstico por medio de distintos métodos.

6 Toma, manipulación y almacenamiento de las muestras

Utilice preferentemente muestras de suero recién extraídas. La extracción de sangre debe seguir los requerimientos de protocolo de su país.

No utilice muestras ictericas, lipemicas, hemolizadas o contaminadas por bacterias. Los sueros con partículas deben ser purificados por centrifugación a baja velocidad (<1000 x g). Las muestras de sangre deben ser recogidas en tubos limpios, secos y vacíos.

Tras la separación, las muestras de plasma han de utilizarse durante las primeras 8 horas y conservarse herméticamente cerradas a 2-8°C/35-46°F hasta 48 horas o congeladas a -20°C/-4°F durante periodos más prolongados.

7 Procedimiento del ensayo

7.1 Preparativos antes de dispensar

Diluya los reactivos concentrados:

Diluya el tampón de muestra concentrado a 1:5 con agua destilada (p.e. 20 ml en 80 ml)

Diluya el tampón de lavado concentrado a 1:50 con agua destilada (p.e. 20 ml en 980 ml).

A fin de evitar errores, es aconsejable marcar las tapas de los distintos calibradores.

Muestras:

Diluya las muestras de suero a 1:101 con tampón de muestra (1x)

p.e. 1000 µl tampón de muestra (1x) + 10 µl suero. Mezcle bien la dilución.

Lavado:

Prepare 20 ml de tampón de lavado diluido (1x) para 8 pocillos o 200 ml para 96 pocillos p.e. 4 ml de concentrado en 196 ml de agua destilada.

Lavado automático:

Tenga en cuenta los volúmenes de exceso requeridos para purgar el instrumento y el volumen muerto en el dispensador del aparato.

Lavado manual:

Descarte el líquido de los pocillos invirtiendo la placa. Golpee vigorosamente el marco con los micropocillos sobre papel absorbente limpio manteniendo la placa invertida. Dispense 300 µl de tampón de lavado diluido dentro de cada pocillo y espere 20 segundos. Repita el procedimiento entero dos veces más.

Microplacas:

Calcule el número de pocillos necesarios para el ensayo. Saque los pocillos no utilizados del marco, póngalos de nuevo en la bolsa de plástico suministrada junto con el desecante y séllela bien (2-8°C/35-46°F).

7.2 Esquema de dispensación

Se sugiere dispensar los calibradores, controles y muestras como sigue:

Para una interpretación *cuantitativa* usar calibradores para establecer una curva estándar

Para una interpretación *cualitativa* usar calibrador cut-off y CalA como control negativo y CalD como control positivo

		1	2	3	4...
Cal antigen	A	CalA	CalB	CalC	CalD
Cal antigen	B	CalA	CalB	CalC	CalD
SS-A	C	P1	P2	P3	P4
SS-B	D	P1	P2	P3	...
Sm	E	P1	P2	P3	...
snRNP/Sm	F	P1	P2	P3	...
Scl70	G	P1	P2	P3	...
Jo-1	H	P1	P2	P3	...

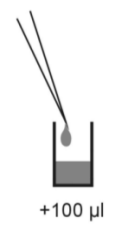
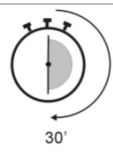
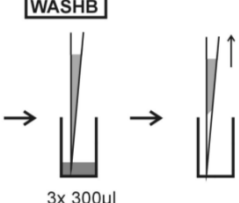
	1	2	3	4...
A	CalA	CC	CalD	
B	CalA	CC	CalD	
C	P1	P2	P3	P4
D	P1	P2	P3	...
E	P1	P2	P3	...
F	P1	P2	P3	...
G	P1	P2	P3	...
H	P1	P2	P3	...

CalA: calibrator A
 CalB: calibrator B
 CalC: calibrator C

CalD: calibrator D
 CC: cut-off calibrator

P1: patient 1
 P2: patient 2
 P3: patient 3

7.3 Esquema de trabajo

Paso	Descripción
1.	Asegúrese de que los preparativos del paso 7.1 (arriba) se han llevado a cabo antes del pipeteado.
2.	Siga los pasos descritos a continuación de acuerdo con los resultados de interpretación cuantitativa y cualitativa que se deseen obtener:
CONTROLES y MUESTRAS	
3.	 <p>Pipetee en los pocillos designados (tal como se describe en el capítulo 7.2) 100 µl de:</p> <ol style="list-style-type: none"> Calibradores (CAL.A a CAL.D) para interp. CUANTITATIVA o Calibrador cut-off (CC) para interp. CUALITATIVA y 100 µl de cada uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> Calibrador A (Cal.A) y Calibrador D (Cal.D), y Suero diluido de los pacientes (P1, P2...)
4.	 <p>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.</p>
5.	 <p>Lave tres veces con 300 µl de tampón de lavado (diluido al 1:50).</p>



CONJUGADO

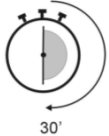
6.

CONJ



Pipetee 100 µl de conjugado en cada pocillo.

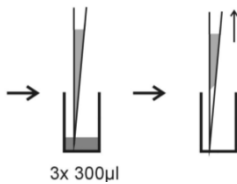
7.



Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.

8.

WASHB



Lave tres veces con 300 µl de tampón de lavado (diluido al 1:50).

SUBSTRATO

9.

SUB



Pipetee 100 µl de substrato TMB en cada pocillo.

10.

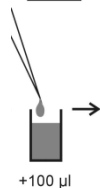


Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F y evite que reciba luz intensa.

PARO

11.

STOP



Pipetee 100 µl de solución de paro en cada pocillo siguiendo el mismo orden que al pipetear el substrato.

12.

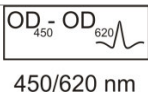


Incube durante 5 minutos como mínimo.

13.

Agite la placa suavemente durante 5 seg.

14.



Lea la absorbancia a 450 nm (se recomienda 450/620 nm) durante los 30 minutos siguientes.



8 Interpretación cualitativo y semicuantitativa

Establezca la curva standard trazando la densidad óptica(DO) de cada calibrador (eje y) con respecto a los correspondientes valores de concentración en U/ml (eje x). Para unos mejores resultados recomendamos coordenadas log/lin y un ajuste a 4-PL. Partiendo de la DO de cada muestra, lea la correspondiente concentración de anticuerpo expresada en U/ml.

Ejemplo de interpretación

Se recomienda el uso de calibradores cut-off de pipeteado en paralelo en cada tanda.

Calibradores / IgG	DO 450/620 nm
0 U/ml	0,042 DO
10 U/ml	0,323 DO
30 U/ml	0,757 DO
100 U/ml	1,602 DO
Calibradore cut-off	
15 U/ml	0,451 DO

Rango Normal	Indeterminado	Resultados Positivos
< 12 U/ml	12 - 18 U/ml	> 18 U/ml

Paciente	Replicado (DO)	Media (DO)	Resultado cualitativo	Resultado (U/ml) semicuantitativo
P 01	0,188/0,186	0,187	negativo	5,0
P 02	1,334/1,335	1,335	positivo	71,4

NO utilice este ejemplo para interpretar el resultado del paciente

Para conocer los datos específicos de lote, consulte el documento adjunto de control de calidad. Los laboratorios deberían realizar un Control de Calidad interno utilizando controles propios y/o un „pool“ de sueros interno tal y como contemplan las regulaciones nacionales.

Cada laboratorio debería establecer su rango normal propio basado en sus propias técnicas, controles, equipamiento y población según sus propios procedimientos establecidos.

En caso de que los valores de los controles no se ajusten a los criterios, el ensayo se considerará válido y deberá repetirse.

Será necesario realizar las siguientes comprobaciones de problemas técnicos: Fechas de caducidad de los reactivos (preparados), condiciones de almacenamiento, pipetas, dispositivos, fotómetro, condiciones de incubación y métodos de lavado.

Si al analizar los elementos se obtuvieron valores exagerados, se produjo algún tipo de desviación o los criterios de validación no se cumplieron por motivos inexplicables, póngase en contacto con el fabricante o el proveedor del producto.

Para la semicuantificación de los resultados, cada valor de DO de paciente puede ser expresado a través del Índice. El Índice se calcula dividiendo la DO del paciente por la DO del cut-off:

Interpretación cualitativa

El cálculo del test *AESKULISA* ENA-6Pro puede llevarse a cabo a través de la comparación directa de la densidad óptica (DO) de cada muestra de paciente con la densidad óptica del calibrador Cut-off. Para la **interpretación cualitativa**, recomendamos que establezca un rango del 20% al rededor del valor del cut-off como zona indeterminada. Todas las muestras que tengan DO superior a este rango se consideran positivas y las muestras con valores de DO inferiores a este rango se consideran negativas.

Negativo		DO paciente	<	0,8 x DO cut-off
Indeterminado	0,8 x	DO cut-off	≤	DO paciente ≤ 1,2 x DO cut-off
Positivo		DO paciente	>	1,2 x OD cut-off

9 Datos Técnicos

Muestra:	suero
Volumen de muestra:	10 µl de muestra diluida a 1:101 con tampón de muestra 1x
Tiempo total de incubación:	90 minutos a temperatura 20-32°C/68-89,6°F
Rango de calibración:	0-100 U/ml
Sensibilidad analítica:	1,0 U/ml
Almacenamiento:	a 2-8°C/35-46°F utilice solo los viales originales
Número de determinaciones:	96 tests

10 Datos de funcionamiento

10.1 Sensibilidad analítica

La prueba del agente de muestra 30 veces en *AESKULISA* ENA-6Pro produjo una sensibilidad analítica de 1,0 U/ml.

10.2 Especificidad y Sensibilidad

La microplaca está revestida con antígenos elevadamente purificados y/o recombinantes (SS-A, SS-B, snRNP/Sm, Sm, Scl-70, Jo-1). No se encontraron reactividades cruzadas con otros autoantígenos.

	Sensibilidad
SS-A	80% para el síndrome de Sjögren
SS-B	40-74% para el síndrome de Sjögren
Sm	10-30% para el LES
U1-snRNP	100 % para la enfermedad mixta del tejido conectivo
Scl 70	20-48% para el escleroderma sistémico
Jo-1	25% para la polimiositis y la dermatomiositis

10.3 Linealidad

Se han analizado con este equipo sueros seleccionados y se encontró que debían diluirse linealmente. No obstante, debido a la naturaleza heterogénea de los autoanticuerpos humanos, pueden haber muestras que no sigan esta regla.

Muestra N° Scl-70	Factor de dilución	concentración medida (U/ml)	concentración esperada (U/ml)	Recuperación (%)
1	1 / 100	112,0	110,0	101,8
	1 / 200	56,4	55,0	102,6
	1 / 400	28,0	27,5	101,8
	1 / 800	14,3	13,8	103,6
2	1 / 100	83,8	85,0	98,6
	1 / 200	41,1	42,5	96,7
	1 / 400	20,8	21,3	97,7
	1 / 800	9,8	10,6	92,5

10.4 Precisión

Para determinar la precisión del ensayo, se valoró la variabilidad (intra e inter-ensayo) a través del análisis de su reproducibilidad en tres muestras de suero. Estas muestras fueron seleccionadas para representar un rango por encima de la curva standard.

Intra-Ensayo		
ENA-6Pro	Media (U/ml)	CV (%)
SSA	45,7	1,5
SSB	124,8	2,6
SnRNP	20,0	3,1
Sm	51,6	1,7
Scl-70	19,3	3,1
Jo-1	65,5	4,2

Inter-Ensayo		
ENA-6Pro	Media (U/ml)	CV (%)
SSA	44,2	1,3
SSB	123,3	2,4
SnRNP	21,7	2,8
Sm	54,6	3,9
Scl-70	22,4	3,7
Jo-1	68,4	1,7

10.5 Calibración

El equipo AESKULISA ENA-6Pro está calibrado contra sueros de referencia del CDC (Centers for Disease Control and Prevention) en Atlanta.

11 Bibliografía

Antinuclear antibody. The Lancet 1984, Sept. 15: 611-13.

Froelich CH, Wallmann H, Skosey JL and Teodorescu M. Clinical value of an integrated ELISA system for the detection of 6 autoantibodies. The Journal of Rheumatology 1990; 17 (2): 192-200.

Mierau R, Genth E. Autoantikörper bei systemischem Lupus erythematodes und verwandten Erkrankungen In: Thomas L. (Hrsg.) Labor und Diagnose. TH-Books, Frankfurt, 1998, 5. Auflage: 843-851.

Schmolke M, Oppermann M, Helmke K, Guder WG. Antibody determination against ENA-a challenge for the routine laboratory. Poster P59, 5 th Dresden Symposium on Autoantibodies, 2000.

