



DCM099-8
Ed. 01/2024

ANA Screen

per analisi di routine

Determinazione qualitativa degli anticorpi di classe IgG contro gli antigeni nucleari nel siero o plasma umano

IVD

LOT

Vedere l'etichetta
esterna

2°C 8°C

Σ
 $\Sigma = 96$ test

REF DKO099

1. SCOPO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

Il dosaggio ANA Screen è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione qualitativa degli anticorpi IgG diretti contro Sm (Smith), RNP/Sm, Scl-70, SS-A (Ro) (52kDa e 60kDa), SS-B (La), Jo1, U1-SmRNP, CENP-B, dsDNA e istoni nel siero o plasma umano da una popolazione adulta. I risultati devono essere impiegati in associazione ad altri dati clinici e di laboratorio come ausilio nella diagnosi delle patologie autoimmuni sistemiche reumatiche.

2. RILEVANZA CLINICA

Gli autoanticorpi antinucleari (ANA) sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi che riconoscono le macromolecole nucleari e i relativi complessi; potrebbero rientrare in questa categoria anche anticorpi contro alcune proteine citoplasmatiche¹⁻⁶. Tali anticorpi si trovano comunemente nei sieri dei pazienti affetti da patologie autoimmuni sistemiche reumatiche (SARD, systemic autoimmune rheumatic disease) e possono legarsi a DNA, RNA e proteine, nonché a complessi di acidi nucleici con proteine essenziali per diverse funzioni intracellulari come la replica e la trascrizione.

I target degli ANA possono essere suddivisi in due gruppi nell'ambito delle patologie autoimmuni sistemiche reumatiche: gli anticorpi che riconoscono il DNA, gli istoni e i nucleosomi^{1,2,5,6}; e quelli che si legano ai complessi di RNA con le proteine leganti l'RNA (RBP, RNA-binding protein) e le piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNP)¹.

Gli autoanticorpi mirati agli antigeni nucleari sono segni distintivi sierologici delle SARD e la loro rilevazione è utilizzata dai medici per supportare la diagnosi di disturbi come il LES, la sindrome di Sjögren, la sclerosi sistemica, la polmiosite e la malattia mista del tessuto connettivo. È ben noto che si tratta di disturbi complessi e caratterizzati dalla presenza di un ampio spettro di autoanticorpi. Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che gli ANA vengono rilevati spesso nei sieri di pazienti affetti da malattie non reumatiche e soggetti sani che non sviluppano una malattia reumatica.

A causa della complessità delle SARD, i test ANA dovrebbero sempre essere considerati insieme alla valutazione dell'anamnesi del paziente, delle manifestazioni cliniche e di altri esami di laboratorio per diagnosticare queste condizioni.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test ANA Screen è un dosaggio immunometrico enzimatico indiretto (ELISA) basato sul legame degli anticorpi presenti con gli antigeni Sm, RNP/Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Scl-70, Jo1, U1-SmRNP, CENP-B, dsDNA e istoni rivestiti sulle micropiastre. Eventuali anticorpi presenti nei calibratori, nei controlli o nei campioni prediluiti dei pazienti si legano alla superficie interna dei pozzetti. Dopo un'incubazione di 30 minuti, la micropietra viene lavata con il tampone di lavaggio per rimuovere i componenti non reattivi del siero.

Una soluzione di coniugato con perossidasi di rafano anti-IgG umane riconosce gli anticorpi di classe IgG legati agli antigeni immobilizzati. Dopo un'incubazione di 30 minuti, il coniugato enzimatico in eccesso, che non è specificamente legato, viene lavato via con il tampone di lavaggio.

Una soluzione di substrato cromogenico contenente TMB viene erogata nei pozzetti. Dopo 15 minuti di incubazione, lo sviluppo del colore viene interrotto aggiungendo la soluzione di arresto. A questo punto, la soluzione diventa gialla. Il livello di colore è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgG presenti nel campione originale.

4. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibratore (1 fiala, 1,2 mL)

Tampone fosfato 0,1 M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$, BSA 3%

CAL1

REF DCE002/09906-0

2. Controlli (2 fiale, 1,2 mL ciascuna)

Tampone fosfato 0,1 M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$, BSA 3%

Controllo negativo

REF DCE045/09901-0

Controllo positivo

REF DCE045/09902-0

3. Diluyente per campione (1 fiala, 100 mL)

Tampone fosfato 0,1 M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$

REF DCE053-0

4. Coniugato (1 fiala, 15 mL)

Coniugato anti h-IgG con perossidasi di rafano (HRP), BSA 0,1%, ProClin $> 0,0015\%$

REF DCE002/09902-0

5. Micropietra rivestita (1 micropietra frangibile)

Micropietra rivestita con antigeni ANA

REF DCE002/09903-0

6. Substrato TMB (1 fiala, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare qualsiasi contatto con la pelle), ProClin $< 0,0015\%$

REF DCE004-0

7. Soluzione di arresto (1 fiala, 15 mL)

Acido solforico 0,15 M (evitare qualsiasi contatto con la pelle)

REF DCE005-0

8. Soluzione di lavaggio conc. 10X (1 fiala, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2 M pH 7,4, ProClin >0,0015%

REF DCE054-0

4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico.

Dispositivi di pipettaggio di precisione Lettore di micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.



Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.

- Alcuni reagenti (coniugato e soluzione di lavaggio) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- **Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]**

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Contiene: ProClin 300

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Alcuni reagenti (calibrators and controls) contengono piccole quantità di azoturo di sodio (NaN₃) <0.1% che può essere tossico se ingerito o assorbito attraverso la pelle o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame per formare azoturi metallici potenzialmente esplosivi. Se si utilizza un lavandino per rimuovere i reagenti, lavare con abbondante acqua per evitare l'accumulo di azoturi.
- Il substrato TMB contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito per via cutanea. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con pelle e occhi.
- La soluzione di arresto consiste in una soluzione diluita di acido solforico. L'acido solforico è velenoso e

corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire ustioni chimiche, evitare il contatto con pelle e occhi.

- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, itterici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- **AVVERTENZA: il reagente coniugato è progettato per garantire la massima sensibilità per la dose e può essere contaminato da agenti esterni se non utilizzato correttamente;** pertanto, si raccomanda di utilizzare materiali di consumo monouso (puntali, flaconi, vassoi, ecc.). Per le dosi divise, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria e non reintrodurre alcun prodotto di scarto nel flacone originale. Inoltre, **per le dosi erogate con l'ausilio di dispositivi automatici e semiautomatici,** prima di utilizzare il coniugato, è consigliabile pulire il sistema per la gestione dei fluidi, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci per evitare la contaminazione del coniugato. Questa **procedura è altamente raccomandata quando il kit viene elaborato utilizzando analizzatori non dotati di puntali monouso.** A tale scopo, DiaMetra fornisce un reagente di decontaminazione separato per la pulizia degli aghi.

- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, il kit è stabile a 2-8 °C per 6 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o plasma (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio).

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C	96 ore
Cicli di congelamento/scongelamento	3 cicli

9. PROCEDURA

9.1. Preparazione dei calibratori (C₁)

I calibratori sono pronti all'uso; la concentrazione del calibratore è stampata sull'etichetta.

I controlli sono pronti per l'uso.

9.2. Preparazione del coniugato

Il coniugato è pronto per l'uso. Miscelare delicatamente per 5 minuti in un mixer a rotazione.

9.3. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto di ogni fiala della soluzione di lavaggio tamponata concentrata (10X) con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura anche di trasferire completamente i cristalli sciaccando il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

9.4. Preparazione dei campioni

La determinazione degli anticorpi ANA può essere eseguita in campioni di siero o plasma umano.

Tutti i campioni di siero e plasma devono essere prediluiti con diluente per campione 1:100; ad esempio, 10 µL di campione possono essere diluiti con 990 µL di diluente per campione.

I campioni a digiuno non sono necessari e non sono richieste preparazioni speciali. Prelevare il sangue tramite venipuntura in Vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule tramite centrifugazione.

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

9.5. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati della prova, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₁), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controlli	Bianco
Calibratore C ₁	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	

Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (22-28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.

Nota importante: durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente.

Lavatore automatico: se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.

Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (22-28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.			
Lavaggio: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL

Incubare per 15 minuti, al buio, a temperatura ambiente (22-28 °C).

Soluzione di arresto	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 o contro il bianco entro 5 minuti.			

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e CV%. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi⁷.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Determinare l'assorbanza media per ogni campione duplicato.

Per ottenere il valore del campione: dividere l'assorbanza media del campione per l'assorbanza del calibratore, quindi moltiplicare per la concentrazione del calibratore, come mostrato di seguito:

$$\text{Conc. campione} = \frac{\text{campione OD}}{\text{OD C1}} \times \text{Conc. C1}$$

La reattività non è collegata in modo lineare alla quantità di anticorpi presenti. Anche se un aumento o una diminuzione della concentrazione di anticorpi provoca un aumento o una diminuzione della reattività, il cambiamento non è proporzionale (ad es., il raddoppio della concentrazione di anticorpi non comporta un raddoppio della reattività).

Per ottenere una maggiore precisione nella determinazione degli anticorpi, si raccomanda di testare diluizioni seriali del campione. La diluizione finale che risulta positiva nel test è la concentrazione di anticorpi del paziente.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

12. METROLOGIA E TRACCIABILITÀ

Il dosaggio ANA Screen è tracciabile agli standard di riferimento degli anticorpi antinucleari (ANA) dell'Autoantibody Standardisation Committee (ASC), Center for Disease Control (CDC) e del WHO anti-dsDNA 15/174.

13. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

ANA Screen (AU/mL)	Interpretazione
< 25	Il campione deve essere considerato negativo
≥ 25	Il campione deve essere considerato positivo

L'indice e l'interpretazione succitati devono essere considerati solo linee guida. I risultati positivi devono essere verificati relativamente all'intero stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione per la terapia deve essere presa in base alle condizioni di ciascun paziente. È consigliabile che ogni laboratorio stabilisca i propri intervalli normali e patologici di anti-ANA nel siero.

14. CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

14.1. Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità sono state determinate basandosi sulla procedura CLSI EP-24 "Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves" utilizzando 50 campioni negativi e 53 campioni positivi eseguiti su un singolo lotto di reagenti.

		DKO099		Totale
		Positivo	Negativo	
Stato reale	Positivo	53	0	53
	Negativo	0	50	50
Totale		53	50	103

Sensibilità diagnostica: 100%

Specificità diagnostica: 100%

14.2. Precisione

La precisione del kit ANA Screen è stata determinata eseguendo un complesso studio di precisione.

Ripetibilità: un totale di 3 campioni di siero è stato analizzato utilizzando 2 lotti di reagenti in 10 repliche per campione, da parte di 3 operatori, una volta al giorno per 5 giorni. I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Risultati di ripetibilità relativi a un lotto rappresentativo:

Campione	n	Risultati +vi	Risultati -vi	Risultati % +vi	Risultati % -vi
Cut-off	150	82	68	54,7	45,3
Negativo	150	1	149	0,7	99,3
Positivo	150	150	0	100,0	0,0

I risultati di riproducibilità per i dati combinati di due lotti sono mostrati di seguito:

Campione	n	Risultati +vi	Risultati -vi	Risultati % +vi	Risultati % -vi
Cut-off	300	163	137	54,3	45,7
Negativo	300	3	297	1,0	99,0
Positivo	300	300	0	100,0	0,0

14.3. Studio su siero-plasma

Lo studio di confronto della matrice ANA Screen è stato eseguito per valutare la differenza tra i vari tipi di provette (provette per la separazione del siero (SST), per plasma in litio eparina, per plasma in sodio eparina e plasma in K2 EDTA) rispetto ai campioni di controllo (siero tappo rosso, senza additivo) secondo CLSI GP34-A "Validation and Verification of Tubes for Venous and Capillary Blood. Specimen Collection". È stato valutato un totale di 20 campioni (16 nativi, 4 artificiali).

Tipo di campione	N. campioni	Risultati rispetto al siero	
		Falso pos	Falso neg
SST	20	0	0
K2 EDTA	20	0	0
Litio-eparina	20	0	0
Sodio-eparina	20	0	0

14.4. Interferenti

Le seguenti sostanze non interferiscono con il dosaggio ANA Screen fino alle concentrazioni riportate nella tabella seguente.

Reagente potenzialmente interferente	Concentrazione di soglia
Bilirubina, coniugata	15 mg/dL
Bilirubina, non coniugata	15 mg/dL
Emoglobina	200 mg/dL
Proteine totali	10 g/dL
Trigliceridi	500 mg/dL

15. LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*⁸. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

16. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

17. BIBLIOGRAFIA

1. Pisetsky DS. Antinuclear antibody testing - misunderstood or misbegotten? *Nat Rev Rheumatol.* 2017 Aug;13(8):495-502.
2. Pisetsky DS. Antinuclear antibodies in rheumatic disease: a proposal for a function-based classification. *Scand J Immunol.* 2012 Sep;76(3):223-8.
3. Fritzler MJ. Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol Biol Rep.* 1996;23(3-4):133-45.
4. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 1995 Apr;24(5):323-58.
5. Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, Grosso S, Cereda A, Guercilena G, Bollani S, Saibeni S, Puttini PS. Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies. *Autoimmun Rev.* 2011 Jan;10(3):150-4.
6. Aggarwal A. Role of autoantibody testing. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014 Dec;28(6):907-20.
7. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
8. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

18. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.

19. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda:

www.diametra.com

Ed. 01/2024

DCM099-8



DCM099-8
Ed. 01/2024

ANA Screen

for routine analysis

Qualitative determination of IgG class antibodies against nuclear antigens in human serum or plasma

IVD

LOT

See external label

2°C 8°C

$\Sigma = 96$ tests

REF DKO099

1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use

For Laboratory Professional Use

The ANA Screen assay is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the qualitative determination of IgG antibodies directed against Sm (Smith), RNP/Sm, Scl-70, SS-A (Ro) (52kDa e 60kDa), SS-B (La), Jo1, U1-SmRNP, CENP-B, dsDNA and Histones in human serum or plasma from an adult population. Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data as an aid in the diagnosis of systemic rheumatic autoimmune diseases.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Anti-nuclear autoantibodies (ANAs) are a heterogeneous group of autoantibodies that recognise nuclear macromolecules and their complexes; antibodies to certain cytoplasmic proteins might also fall into this category¹⁻⁶. These antibodies commonly occur in the sera of patients with systemic autoimmune rheumatic diseases (SARDs) and can bind to DNA, RNA and proteins, as well as complexes of nucleic acids with proteins that are essential for different intracellular functions such as replication and transcription.

ANAs' targets can be divided into two groups in the context of systemic rheumatic autoimmune diseases: antibodies that recognise DNA, histones and nucleosomes^{1,2,5,6}; and those that bind to complexes of RNA with RNA-binding proteins (RBPs) and small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs)¹.

Autoantibodies directed to nuclear antigens are serological hallmarks of SARDs and their detection is used by clinicians to support the diagnosis of disorders such as SLE, Sjögren syndrome, systemic sclerosis, polymyositis and mixed connective tissue disease. It is well documented that these are complex disorders and characterised by the presence of a wide spectrum of autoantibodies. Furthermore, it has widely been shown that ANAs are also frequently found in the sera of patients with non-rheumatic diseases and healthy subjects that do not develop a rheumatic disease.

Due to the complexity of SARDs, ANA tests should always be considered together with the evaluation of the patient's history, clinical manifestations and other laboratory tests to diagnose these conditions.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The ANA Screen test is an indirect enzyme immunometric assay (ELISA) based on the binding of present antibodies with Sm, RNP/Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Scl-70, Jo1, U1-SmRNP, CENP-B, dsDNA and Histones antigens coated on the microplates. Any antibodies present in calibrators, controls or prediluted patient samples bind to the inner surface of the wells. After a 30 minutes incubation the microplate is washed with wash buffer for removing non-reactive serum components.

An anti-human-IgG horseradish peroxidase conjugate solution recognises IgG class antibodies bound to the immobilised antigens. After a 30 minutes incubation any 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 colour 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.

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrator (1 vial, 1.2 mL)

Phosphate buffer 0.1M, NaN₃ < 0.1%, BSA 3%

CAL1

REF DCE002/09906-0

2. Controls (2 vials, 1.2 mL each)

Phosphate buffer 0.1M, NaN₃ < 0.1%, BSA 3%

Negative Control

REF DCE045/09901-0

Positive Control

REF DCE045/09902-0

3. Sample Diluent (1 vial, 100 mL)

Phosphate buffer 0.1M, NaN₃ < 0.1%

REF DCE053-0

4. Conjugate (1 vial, 15 mL)

Anti h-IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP), BSA 0.1%, ProClin >0.0015%

REF DCE002/09902-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with ANA antigens

REF DCE002/09903-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (avoid any skin contact), ProClin <0.0015%

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

8. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)
Phosphate buffer 0.2M pH 7.4, ProClin <0.0015%
REF DCE054-0

4.2. Materials required but not provided

Distilled water

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Precision Pipetting Devices Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

5. 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.
-  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 (conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- **Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]**

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- Some reagents (calibrator, controls and sample diluent) contain small amounts of Sodium Azide (<0.1%) as preservative which 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, wash 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.

6. 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.
- 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.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately **validated for its intended use/purpose**
- 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, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- **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 analysers which are not equipped with disposable tips.**
For this purpose, DiaMetra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8°C until the expiry date stated in the external kit label.
- Once opened, the kit is stable at 2 – 8°C for 6 months.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 – 8°C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) samples.

Sample Storage	Duration
2-8°C	96 hours
Freeze/thaw cycles	3 cycles

9. PROCEDURE

9.1. Preparation of the Calibrator (C₁)

Calibrator is ready to use; the concentration of the Calibrator is printed on the label.

The Controls are ready to use.

9.2. Preparation of the Conjugate

The conjugate is ready to use. Mix gently, for 5 minutes, on a roller mixer.

9.3. 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.

It is possible to observe the presence of crystals within the concentrated wash solution; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals. For greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care also to transfer crystals completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

9.4. Preparation of Samples

For determination of ANA antibodies, human serum or plasma are the preferred sample matrixes.

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

Fasting samples are not necessary and no special preparations are required.

Collect blood by venepuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

9.5. 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.

10. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit controls provided in the kit should be tested as unknowns and are intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of each control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

DiaMetra recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories⁷.

11. CALCULATION OF RESULTS

Determine the mean absorbance for each duplicate sample.

To obtain sample value: divide the mean absorbance of the sample by the absorbance of the Calibrator, then multiply by the concentration of the Calibrator, as shown below:

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

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 (e.g., 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.

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

12. METROLOGY AND TRACEABILITY

The ANA Screen assay is traceable to the Antinuclear Antibodies (ANA) Reference Standards by Autoantibody Standardisation Committee (ASC) - Center for Disease Control (CDC) and WHO anti-dsDNA 15/174.

13. INTERPRETATION OF RESULTS

ANA Screen (AU/ mL)	Interpretation
< 25	The sample should be considered negative
≥ 25	The sample should be considered positive

The above index and interpretation should be considered as guidelines only. 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 anti-ANA.

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

14.1. Diagnostic Sensitivity and Specificity

The sensitivity and specificity were determined with guidance from CLSI EP-24 "Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves" using 50 negative and 53 positive samples run on a single reagent lot.

		DKO099		Total
		Positive	Negative	
True state	Positive	53	0	53
	Negative	0	50	50
Total		53	50	103

Diagnostic sensitivity: 100%

Diagnostic specificity: 100%

14.2. Precision

Precision of the ANA Screen kit was determined by performing a complex precision study.

Repeatability: A total of A total of 3 serum samples were assayed using 2 lots of reagents in 10 replicates per sample, by 3 operators, once a day for 5 days. Data from one representative lot is shown below:

Repeatability results from one representative lot:

Sample	n	+ve results	-ve results	% +ve results	% -ve results
Cut off	150	82	68	54.7	45.3
Negative	150	1	149	0.7	99.3
Positive	150	150	0	100.0	0.0

Reproducibility results for the combined data from two lots is shown below:

Sample	n	+ve results	-ve results	% +ve results	% -ve results
Cut off	300	163	137	54.3	45.7
Negative	300	3	297	1.0	99.0
Positive	300	300	0	100.0	0.0

14.3. Serum-plasma study

The ANA Screen matrix comparison study was performed to evaluate the difference across tube types (serum separator tubes (SST), lithium heparin plasma, sodium heparin plasma and K2 EDTA plasma) versus the control samples (red top serum, without additive) following CLSI GP34-A "Validation and Verification of Tubes for Venous and Capillary Blood. Specimen Collection". A total of 20 samples (16 native, 4 contrived) were evaluated.

Sample Type	No. Samples	Results vs Serum	
		False pos	False neg
SST	20	0	0
K2 EDTA	20	0	0
Lithium heparin	20	0	0
Sodium heparin	20	0	0

14.4. Interferents

The following substances do not interfere in the ANA Screen assay when the concentrations presented in the following table are below the stated threshold.

Potentially Interfering Reagent	Threshold Concentration
Bilirubin, conjugated	15 mg/dL
Bilirubin, unconjugated	15 mg/dL
Haemoglobin	200 mg/dL
Total Protein	10 g/dL
Triglyceride	500 mg/dL

15. LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays⁸. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.

16. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

17. BIBLIOGRAPHY

1. Pisetsky DS. Antinuclear antibody testing - misunderstood or misbegotten? *Nat Rev Rheumatol*. 2017 Aug;13(8):495-502.
2. Pisetsky DS. Antinuclear antibodies in rheumatic disease: a proposal for a function-based classification. *Scand J Immunol*. 2012 Sep;76(3):223-8.
3. Fritzler MJ. Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol Biol Rep*. 1996;23(3-4):133-45.
4. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 1995 Apr;24(5):323-58.
5. Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, Grosso S, Cereda A, Guercilena G, Bollani S, Saibeni S, Puttini PS. Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2011 Jan;10(3):150-4.
6. Aggarwal A. Role of autoantibody testing. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014 Dec;28(6):907-20.
7. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
8. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

18. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

19. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.

The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found below and on the company website: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM099-8



DCM099-8
Ed. 01/2024

ANA Screen

para el análisis de rutina

Determinación cualitativa de anticuerpos de clase IgG contra antígenos nucleares en suero o plasma humano

IVD

LOT

Ver etiqueta
externa

2°C 8°C

Σ = 96 pruebas

REF DKO099

1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

El ensayo ANA screen es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* cuya finalidad es la determinación cualitativa de anticuerpos IgG dirigidos contra Sm (Smith), RNP/Sm, Scl-70, SS-A (Ro) (52 kDa y 60 kDa), SS-B (La), Jo1, U1-SmRNP, CENP-B, dsDNA e histonas en suero o plasma humano de una población adulta. Los resultados deben utilizarse como ayuda en el diagnóstico de enfermedades reumáticas autoinmunitarias sistémicas junto con otros datos clínicos y de laboratorio.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA

Los autoanticuerpos antinucleares (ANA) son un grupo heterogéneo de autoanticuerpos que reconocen las macromoléculas nucleares y sus complejos; los anticuerpos contra ciertas proteínas citoplasmáticas también pueden entrar en esta categoría¹⁻⁶. Estos anticuerpos suelen aparecer en el suero de pacientes con enfermedades reumáticas autoinmunitarias sistémicas (ERAS) y pueden unirse al ADN, al ARN y a las proteínas, así como a complejos de ácidos nucleicos con proteínas que son esenciales para diversas funciones intracelulares, como la replicación y la transcripción.

Las dianas de los ANA pueden dividirse en dos grupos en el contexto de las enfermedades reumáticas autoinmunitarias sistémicas: los anticuerpos que reconocen el ADN, las histonas y los nucleosomas^{1,2,5,6}; y los que se unen a complejos de ARN con proteínas de unión a ARN (RBP) y ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP)¹.

Los autoanticuerpos dirigidos a los antígenos nucleares son balizas serológicas de las ERAS y los especialistas usan su detección para respaldar el diagnóstico de trastornos como el LES, el síndrome de Sjögren, la esclerosis sistémica, la polimiositis y la enfermedad mixta del tejido conectivo. Hay mucha documentación que demuestra que se trata de trastornos complejos y caracterizados por la presencia de un amplio espectro de autoanticuerpos. Además, está suficientemente demostrado que los ANA también se encuentran con frecuencia en el suero de pacientes con enfermedades no reumáticas y de personas sanas que no desarrollan una enfermedad reumática.

Debido a la complejidad de las ERAS, siempre hay que considerar la realización de pruebas de ANA junto con la evaluación de los antecedentes médicos del paciente, las

manifestaciones clínicas y otras pruebas de laboratorio para diagnosticar estas afecciones.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba ANA screen es un ensayo inmunoanalítico de adsorción (ELISA) indirecto basado en la unión de los anticuerpos presentes con los antígenos Sm, RNP/Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Scl-70, Jo1, U1-SmRNP, CENP-B, dsDNA e histonas recubiertos en las microplacas. Cualquier anticuerpo presente en los calibradores, controles o muestras de pacientes prediluidas se une a la superficie interior de los pocillos. Tras una incubación de 30 minutos, la microplaca se lava con tampón de lavado para eliminar los componentes de suero no reactivos.

Una solución de anticuerpo contra IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante reconoce los anticuerpos de clase IgG unidos a los antígenos inmovilizados. Después de 30 minutos de incubación, el exceso de conjugado enzimático que no se ha unido específicamente se elimina con tampón de lavado.

Una solución de sustrato cromogénico que contiene TMB se dispensa a los pocillos. Tras 15 minutos de incubación, se detiene el desarrollo del color añadiendo la solución de detención. La solución se vuelve amarilla en este punto. El nivel de color es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos de IgG presentes en la muestra original.

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibrador (1 vial, 1,2 mL)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN₃ <0,1 %, BSA 3%

CAL1

REF DCE002/09906-0

2. Controles (2 viales, 1,2 mL cada uno)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN₃ <0,1 %, BSA 3%

Control negativo

REF DCE045/09901-0

Control positivo

REF DCE045/09902-0

3. Diluyente de muestras (1 vial, 100 mL)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN₃ <0,1%

REF DCE053-0

4. Conjugado (1 vial, 15 mL)

Anticuerpo AntiIgG-h conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), BSA 0,1 %, ProClin >0.0015%

REF DCE002/09902-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca que se puede romper)

Microplaca recubierta con antígenos ANA

REF DCE002/09903-0

6. Sustrato de TMB (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel),
ProClin <0,0015%

REF DCE004-0

7. Solución de detención (1 vial, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 M (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

8. Conc. 10X Solución de lavado (1 vial, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2 M pH 7,4, ProClin >0,0015%

REF DCE054-0

4.2. Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático.

Dispositivo de pipeteo de precisión Lector de microplacas
(450 nm, 620-630 nm)

5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
-  El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos (conjugado y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,015%, <0.06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

• **Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008**

[CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Atención

Contiene: ProClin 300

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- Algunos reactivos (calibrador y controles) contienen pequeñas cantidades de azida sódica (NaN₃) <0,1% que puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre para formar azidas metálicas

potencialmente explosivas. Si elimina los reactivos en un fregadero, lávelos con gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azida. El sustrato de TMB contiene un irritante que puede ser perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.

- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente validado para su uso previsto.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, ictericas o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.
- **ADVERTENCIA: el reactivo conjugado está diseñado para garantizar la máxima sensibilidad de la dosis y puede contaminarse con agentes externos si no se utiliza correctamente;** por lo tanto, se recomienda utilizar consumibles desechables (puntas, frascos, bandejas, etc.). Para dosis divididas, tome la cantidad exacta de conjugado necesaria y no vuelva a introducir ningún

producto de desecho en el frasco original. Además, **para las dosis dispensadas mediante dispositivos automáticos y semiautomáticos**, antes de utilizar el conjugado, es aconsejable limpiar el sistema de manipulación de fluidos, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteinización y descontaminación sean eficaces para evitar la contaminación del conjugado. **Este procedimiento es muy recomendable cuando el kit se procesa con analizadores que no están provistos de puntas desechables.**

Para ello, DiaMetra proporciona un reactivo de descontaminación independiente para la limpieza de las agujas.

- Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit entre 2 y 8° C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, el kit es estable a 2-8 °C durante 6 meses.
- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o plasma (heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio).

Almacenamiento de muestras	Duración
Entre 2 y 8 °C	96 horas
Ciclos de congelación/descongelación	3 ciclos

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de los calibradores (C₁)

Los calibradores están listos para su uso; la concentración del calibrador está impresa en la etiqueta.

Los controles están listos para su uso.

9.2. Preparación del conjugado

El conjugado está listo para su uso. **Mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.**

9.3. Preparación de la solución de lavado

Diluya el contenido de cada vial del concentrado de solución de lavado tamponada (10X) con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL antes de su uso. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de

solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

9.4. Preparación de las muestras

La determinación de los anticuerpos ANA se puede realizar en muestras de suero o plasma humano.

Todas las muestras de suero y plasma deben diluirse previamente con diluyente de muestra 1:100; por ejemplo, 10 µL de muestra pueden diluirse con 990 µL de diluyente de muestra.

No es necesario tomar muestras en ayunas y no se requiere ninguna preparación especial. Obtenga la sangre por venopunción en Vacutainers y separe el suero (tras la formación del coágulo) o el plasma de las células por centrifugación.

Almacenar la muestra a –20 °C si la determinación no se lleva a cabo el mismo día que se recoge la muestra. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.5. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2-8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₁), dos por cada control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Controles	Blanco
Calibrador C ₁	100 µL		
Controles		100 µL	
Muestra diluida		100 µL	

Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (22-28 °C).

Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.

Nota importante: en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente.

Lavadora automática: si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.

Conjugado	100 µL	100 µL	
Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (22-28 °C). Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Lavado: siga las mismas indicaciones del punto anterior.			
Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incube durante 15 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
Agite suavemente la microplaca. Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.			

10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DiaMetra recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control⁷.

11. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Determine la absorbancia media de cada muestra duplicada.

Para obtener el valor de la muestra: divida la absorbancia media de la muestra por la absorbancia del calibrador, y

luego multiplique por la concentración del calibrador, como se indica a continuación:

$$\text{Conc. muestra} = \frac{DO \text{ muestra}}{DO \text{ C1}} \times \text{Conc. C1}$$

La reactividad no está relacionada de forma lineal con la cantidad de anticuerpos presentes. Aunque un aumento o una disminución de la concentración de anticuerpos da lugar a un aumento o a una disminución de la sensibilidad, el cambio no es proporcional (por ejemplo, duplicar la concentración de anticuerpos no duplica la sensibilidad).

Para lograr una mayor precisión en la determinación de los anticuerpos, se recomienda analizar diluciones seriales de la muestra. La dilución final que proporciona un resultado positivo en la prueba es la concentración de anticuerpos del paciente.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los calibradores y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

12. METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD

El ensayo ANA screen se ha establecido respecto de los estándares de referencia de anticuerpos antinucleares (ANA) mediante el Autoantibody Standardisation Committee (ASC) - Center for Disease Control (CDC) y anti-dsDNA de la OMS 15/174.

13. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

ANA Screen (UA/mL)	Interpretación
<25	La muestra debe considerarse negativa.
≥ 25	La muestra debe considerarse positiva.

El índice y la interpretación anteriores deben tenerse en cuenta solamente como una guía. Los resultados positivos deben verificarse en función del estado clínico del paciente en su totalidad. Además, cada decisión terapéutica debe tomarse de forma individual para cada paciente.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales y patológicos de anti-ANA en suero.

14. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

14.1. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico

La sensibilidad y la especificidad se determinaron según las directrices del CLSI EP-24 «Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves» utilizando 50 muestras negativas y 53 muestras positivas de un mismo lote de reactivos.

		DKO099		Total
		Positivo	Negativo	
Estado real	Positivo	53	0	53
	Negativo	0	50	50
Total		53	50	103

Sensibilidad del diagnóstico: 100 %

Especificidad del diagnóstico: 100 %

14.2. Precisión

La precisión del kit del ANA screen se determinó mediante la realización de un estudio de precisión complejo.

Repetibilidad: Se analizaron un total de 3 muestras de suero utilizando 2 lotes de reactivos en 10 réplicas por muestra, por 3 operadores, una vez al día durante 5 días. A continuación se muestran los datos de un lote representativo:

Resultados de repetibilidad de un lote representativo:

Muestra	n	Resultados +	Resultados -	% de resultados +	% de resultados -
Umbral	150	82	68	54,7	45,3
Negativo	150	1	149	0,7	99,3
Positivo	150	150	0	100,0	0,0

A continuación se muestran los resultados de reproducibilidad de los datos combinados de dos lotes:

Muestra	n	Resultados +	Resultados -	% de resultados +	% de resultados -
Umbral	300	163	137	54,3	45,7
Negativo	300	3	297	1,0	99,0
Positivo	300	300	0	100,0	0,0

14.3. Estudio en suero-plasma

El estudio de comparación de matrices del ANA screen se realizó para evaluar la diferencia entre los tipos de tubos (tubos separadores de suero (SST), plasma con heparina de litio, plasma con heparina de sodio y plasma con K2 EDTA) frente a las muestras de control (suero rojo, sin aditivo) siguiendo el CLSI GP34-A «Validation and Verification of Tubes for Venous and Capillary Blood. Specimen Collection». Se evaluaron un total de 20 muestras (16 nativas, 4 artificiales).

Tipo de muestra	N.º de muestras	Resultados frente al suero	
		Falsos pos	Falsos neg
SST	20	0	0
K2 EDTA	20	0	0
Heparina de litio	20	0	0
Heparina sódica	20	0	0

14.4. Interferencias

Las sustancias siguientes no interfieren en el ensayo ANA screen cuando las concentraciones presentadas en la tabla siguiente están por debajo del umbral indicado.

Reactivos que pueden interferir	Límite máximo de concentración
Bilirrubina, conjugada	15 mg/dL
Bilirrubina, no conjugada	15 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Proteína total	10 g/dL
Triglicéridos	500 mg/dL

15. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este ensayo no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*⁸. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

16. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. Pisetsky DS. Antinuclear antibody testing - misunderstood or misbegotten? *Nat Rev Rheumatol*. 2017 Aug;13(8):495-502.
2. Pisetsky DS. Antinuclear antibodies in rheumatic disease: a proposal for a function-based classification. *Scand J Immunol*. 2012 Sep;76(3):223-8.
3. Fritzler MJ. Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol Biol Rep*. 1996;23(3-4):133-45.
4. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 1995 Apr;24(5):323-58.
5. Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, Grosso S, Cereda A, Guercilena G, Bollani S, Saibeni S, Puttini PS. Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2011 Jan;10(3):150-4.
6. Aggarwal A. Role of autoantibody testing. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014 Dec;28(6):907-20.
7. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
8. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

18. IDENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM099-8

19. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante y/o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional.

Se puede contactar con el fabricante a través de su servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los

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