



DIASpot MultiQUANT Neptune ANA19 IgG

KAPDTANA19N



History

Summary of change :

Previous Version :	Current Version :
180103/1	200224/1
Multilanguage IFU	Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: https://www.diasource-diagnostics.com/ "
No IVD symbol	IVD symbol added
LOT : 180103/1	Version: 200224/1
PI number : 1701394	No PI number
No manufacturer symbol	Manufacturer symbol added



DIASpot MultiQUANT Neptune

ANA¹⁹ IgG

en

KAPDTANA19N

PROTOCOL : 02

IN VITRO DIAGNOSTIC

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1. INTENDED USE

DIASpot Neptune ANA¹⁹ IgG is an Immunodot kit intended for the detection in human sera of IgG autoantibodies against Nucleosome, dsDNA, Histones, Sm, RNP (68kD/A/C), Sm/RNP, SSA/Ro 60kD, SSA/Ro 52kD, SSB, Scl-70, RNA Polymerase III, Ku, PM-Scl 100, Mi-2, Jo-1, CENP-A/B, PCNA, Ribosome P0 and DFS70 antigens. More information on the source/type of antigens is available via technical support department at tech.support@diasource.be

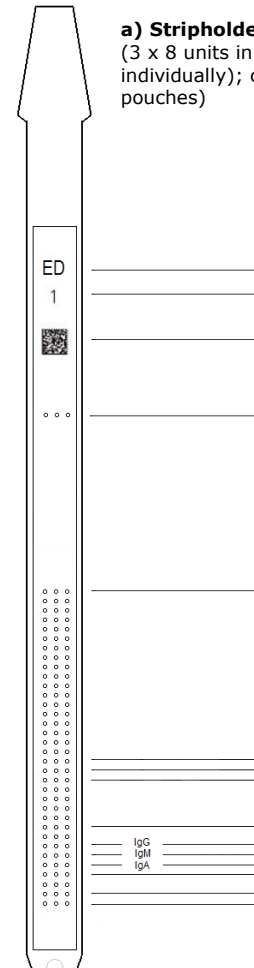
2. PRINCIPLE OF THE TEST

This kit is intended to be performed on the *Neptune Instrument*. The test is based on the principle of an Enzyme Immunoassay. The test strips are composed of a membrane fixed on a specific plastic support. During the automated test procedure, the Neptune Instrument sequentially incubates the strips in the wells of ready-to-use reagent cartridges. Briefly: the strips are first incubated with diluted patients' sera. Human antibodies, if present, bind to the corresponding specific antigen(s) on the membrane. Unbound or excess antibodies are removed by washing. Upon further incubation into AP-conjugated goat antibodies against human IgG, the enzyme conjugate binds to the antigen-antibody complexes. After removal of excess conjugate by washing, the strips are finally incubated into a substrate solution. Enzyme activity, if present, leads to the development of purple dots on the membrane pads. The intensity of the coloration is directly proportional to the amount of antibody present in the sample. All the measured results are fully quantitative thanks to a 6 point built-in calibration curve, including blank control. Different types of controls (sample, conjugate and substrate) are also coated on the strips. Their presence validates the whole process of the test (from sample loading to substrate kinetics, through conjugate specificity / reactivity). For optimum precision, all dots are coated in a triplicate microdot format, allowing calculation of a mean value and a confidence interval for each parameter (antigens, calibration curve and controls).

3. KIT CONTENTS

Abbreviations in alphabetic order:

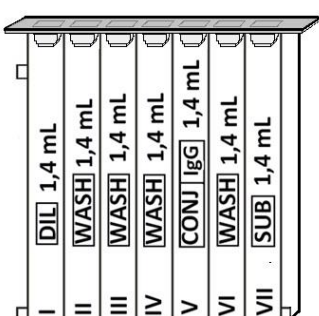
AP = Alkaline Phosphatase; BCIP = Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphate; KCl = Potassium Chloride; MgCl₂ = Magnesium Chloride; MIT = MethylthioThiazolone; NaCl = Sodium Chloride; NaN₃ = Sodium Azide; NBT = NitroBlue Tetrazolium; TBS = Tris Buffer Saline



a) Stripholder with microdot strips
(3 x 8 units in plastic holders, breakable individually); conditioned in aluminum pouches)

b) Absorbent paper (for drying of tips pt 8.1.16), sealed together with microdot strips in aluminum pouch

c) Cartridge (24 units having each 7 compartments; sealed)



Diluent buffer
Ist position, 1 x 1,4 ml (yellow)
contains: H₂O • TBS • NaCl • Tween • Preservative (MIT) • Dye • Antifoam emulsion

Wash buffer
IInd, IIIrd, IVth and VIth position, 4 x 1,4 ml (colourless)
contains: H₂O • TBS • NaCl • Tween • Preservative (MIT) • Antifoam emulsion

Conjugate
Vth position, 1 x 1,4 ml (red)
contains: H₂O • TBS • NaCl • KCl • MgCl₂ • AP-conjugated goat anti-human IgG • Preservative (MIT) • Dye • Antifoam emulsion

Substrate
VIIth position, 1 x 1,4 ml (pale yellow solution)
contains: H₂O • NaN₃ (0.05 %) • MgCl₂ • TBS • NBT Stabilizer • NBT • BCIP • Antifoam emulsion

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Neptune, Neptune Quantification Software (minimum version 3.0), Micropipettes / Laboratory gloves

5. STORAGE

The test kit must be stored at a temperature between +2°C to +8°C. Do not freeze. After initial opening of the kit, unused reagent cartridges must be stored at 2-8°C protected from (sun)light preferably inside the original kit box. Unused strips have to be placed back into the provided pouches, sealed and stored at 2-8°C preferably inside the original kit box. When stored properly, all test kit components are stable until the indicated expiry date.

6. SAFETY PRECAUTIONS (Please also always refer to the Neptune Instrument Manual)

All reagents are for in vitro diagnostic and professional use only. The test kit should be processed by trained technical staff only.

The kit contains potentially hazardous components, thus contact with skin, eyes or mucosae has to be avoided.

Patient samples shall be handled with care as being a potential infection hazard.

Waste disposal: Patient samples and incubated test strips should be handled as infectious waste. Other reagents do not need to be collected separately, unless stated otherwise in official regulations.

DIAsource and its authorized distributors shall not be liable for damages indirectly or consequentially brought about by changing or modifying the procedure indicated. In any case, GLP should be applied with all general and individual regulations to the use of this kit.

7. SAMPLE COLLECTION, HANDLING AND STORAGE

Blood samples can be collected in dry tubes or in tubes containing EDTA, heparin or citrate. After separation serum or plasma samples can generally be stored at 2-8°C for up to three days. Long term storage requires freezing at -20°C. Avoid repeated freezing/thawing cycles. After freezing always agitate samples before use to ensure homogeneity.

8. ASSAY PROCEDURE

BASIC INFORMATION, HANDLING AND TIPS:

TEST PROCESS principle:

After manual loading of the strips and reagent cartridges, the incubation and washing steps of the procedure are automatically processed by the NEPTUNE INSTRUMENT which ensures an efficient circulation of fluids over the strips by continuously agitating them up and down in the wells of ready-to-use reagent cartridges. The whole test procedure is run at room temperature.

STRIPS description:

The reactive (front) side of the strips is coated with antigens which appear as faint blue dots. This coloration ensures that all antigens have been correctly spotted onto the membrane. The coloration disappears during the processing of the test. This front side also displays a strip number and a 2-dimensional square barcode for traceability of the strips after removal from the NEPTUNE INSTRUMENT at the end of the test.



The non-reactive (back) side of the strips displays both alphanumeric and bar-coded information for identification of the strip type and lot number by the NEPTUNE INSTRUMENT.



The strips must be manually inserted into the dedicated clamp before starting the automated process (see Test Preparation hereafter, pt 8.1.4). During this operation, avoid touching the membrane zone of the strips with fingers. Always wear laboratory gloves and use the plastic parts (strip support) for handling or manipulation.

REAGENT CARTRIDGES description: (see image on page 1)

The reagent cartridges are composed of 7 different wells filled with ready-to-use reagents. The cartridges are sealed, and the reagent wells are hermetically separated. The sealing has to be removed before starting the test. Once opened, manipulate the cartridges with care in order to avoid reagent spilling and contamination from well to well.

The rear (back) side of the cartridges is labelled with both alphanumeric and bar-coded information for identification of the cartridge type and lot number by the NEPTUNE INSTRUMENT.

The cartridges must be manually loaded onto the dedicated cartridge holder before starting the automated process (see Test Preparation hereafter, pt 8.1.10). The front and rear (back) sides of the cartridges have, respectively, a bottom triangular and two (bottom + top) square plastic edges for secure position and orientation into the holder.

STRIPS/CARTRIDGES associations

The strips and cartridges of a same test kit share the same lot number and are dedicated to be associated in lot-specific pairs. Do not associate, in a same pair, a strip and a cartridge with different lot numbers as this will be detected as an invalid setting by the NEPTUNE INSTRUMENT and will stop the process.

As far as each strip/cartridge pair is valid, the NEPTUNE INSTRUMENT can process strips/cartridges associations of different kits; However, only kits having the same protocol number (same incubation time and sequence) can be processed together in one same run (please refer to the protocol number indicated under the kit reference at the top of first page).

8.1 Test preparation

- Allow all kit components to equilibrate at room temperature (+18°C to +25°C) before use.
- A working list (either edited from Neptune software, or external) should always be prepared for easy loading and correct association of strips, cartridges and patient samples.
- Make sure that the cartridge holder is fixed in its emplacement in the Neptune instrument.
- Make sure that the Neptune Instrument is plugged in.

The following steps sequence summarizes the loading and preparation of the Neptune instrument, test strips, reagent cartridges and patient samples before starting the test. For detailed information or in case of any problem met at one of the following steps, please refer to the Manual of Use of the Neptune instrument.

1. Switch ON the NEPTUNE INSTRUMENT and wait a few seconds until the date and time are displayed on the touch screen.
2. Confirm the correct Date and Time by pressing ✓ on the touch screen (in case of first use or for reset, refer to the manual of use of the NEPTUNE INSTRUMENT) → “Initialize?” is displayed on the screen.
3. Confirm Initialization by pressing ✓ on the touch screen → the horizontal arm of the instrument automatically moves forward to a central (stand-by) position → “Load strips (24)” is displayed on the screen
4. (Do not set nor confirm the number of strips at this step). Remove the clamp from its emplacement on the arm by gently pulling it upwards and load the strips to be tested: handle the clamp with numbered side facing up (open position) and insert the strips, also with numbered (reactive) side facing up, by slipping the upper plastic part (tongue) into the dedicated holes of the clamp. Apply a gentle pressure to ensure that the plastic tongue has reached the bottom end of the hole.

Notes:

- Always start loading into position 1 of the clamp (left side) and do not leave empty spaces between the strips!
 - After complete loading, check visually the vertical, horizontal and lateral alignment of the strips. Any obvious misalignment should be corrected by unloading the strip(s) from the clamp and loading them again.
 - Be careful: any plastic bits remaining after breaking apart the individual strip holders may hinder the processing on the instrument and/or the reading with the Neptune scanner; please remove them with scissors.
5. Replace the clamp in its emplacement on the arm by gently pushing it downwards
 6. Set the number of loaded strips using the up and down arrows on the touch screen.
 7. Confirm the number of loaded strips by pressing ✓ on the touch screen → the horizontal arm automatically moves backward to stand over the alignment holes of the cartridge holder → “Check alignment” is displayed on the screen.
 8. Use the “JOG” function on the screen to check the correct alignment of the strips: maintain a gentle pressure on the down arrow on the touch screen until the bottom of the strips enters into the alignment holes of the cartridge holder. If correctly aligned, the strips will not touch the outlines of the holes.

Note: in case of misalignment (contact of the strips with the cartridge holder), please refer to the Manual of Use of the NEPTUNE INSTRUMENT).

9. Confirm the correct alignment of the strips by pressing ✓ on the touch screen → the NEPTUNE INSTRUMENT lowers the strips completely into the alignment holes and reads the barcodes of the strips → after complete barcode reading, “Load reagent” is displayed on the touch screen.

Note: in case of failure to read one or more strip(s) barcode(s) (flashing LED at the unread position), please refer to the Manual of Use of the NEPTUNE INSTRUMENT.

10. Unseal the reagent cartridges and insert them under their respective strips in the dedicated notches of the cartridge holder.

11. Confirm complete loading by pressing ✓ on the touch screen → the NEPTUNE INSTRUMENT reads the cartridges barcodes and checks the correct association with the strips → after complete barcode reading, the number of strips (validated strips/cartridges associations) is displayed on the screen.
Note: in case of failure to read one or more cartridge(s) barcode(s), or in case of detection of a wrong strip/cartridge association (flashing LED at the corresponding position), please refer to the Manual of Use of the NEPTUNE INSTRUMENT.
12. Confirm the number of strips by pressing ✓ on the touch screen → the protocol number identified on the barcodes is displayed on the screen (**Protocol ID xx.**)
13. Confirm the protocol number by pressing ✓ on the touch screen → **"Please close cover."** is displayed on the screen.
14. Close the cover of the NEPTUNE INSTRUMENT and confirm closing by pressing ✓ on the touch screen → the NEPTUNE INSTRUMENT proceeds to a first washing (pre-treatment) step by incubating the strips into the 2nd well of the cartridges (processing time: 1 minute) → At the end of the wetting step, **"Please open cover."** is displayed on the screen.
15. Open the cover of the NEPTUNE INSTRUMENT and confirm opening by pressing ✓ on the touch screen → the horizontal arm automatically moves forward to the front of the instrument and swings the strips to an oblique position → **"Dry strips"** is displayed on the screen.
16. Dry the strips by gently applying absorbent paper onto the basis of the bottom small cavity (sample loading hole).
17. Confirm drying by pressing ✓ on the touch screen → **"Apply samples"** is displayed on the screen.
18. Apply samples by pipeting 10 µl of patient serum/plasma into the bottom sample loading holes of the strips.
Note: If preferred, the 10µl of the serum can be directly pipetted into the Diluent Buffer ("Well I") of the cartridge. This operation can be done at any time from opening of the cartridges (see Point 8.1.10).
19. Confirm samples' loading by pressing ✓ on the touch screen → **"Please close cover"** is displayed on the screen.
20. Close the cover of the NEPTUNE INSTRUMENT and confirm closing by pressing ✓ on the touch screen → the NEPTUNE INSTRUMENT starts the test automatically by proceeding the following steps sequence (**Protocol 02**):

8.2 Test processing (Protocol 2)

Step	Description	Processing time
01.	The strips are incubated into the 1 st well of the cartridge (<i>Diluent Buffer</i>). Upon contact with the liquid in the wells and agitation, the pre-loaded patients' samples (see 8.1.18) are released from the small cavity at the bottom of the strips and are diluted in the buffer.	30 min
02.	The clamp moves forwards and the strips are incubated into the 2 nd well of the cartridge (<i>Wash Buffer</i>)	2 min
03.	The clamp moves forwards and the strips are incubated into the 3 rd well of the cartridge (<i>Wash Buffer</i>)	2 min
04.	The clamp moves forwards and the strips are incubated into the 6 th well of the cartridge (<i>Wash Buffer</i>)	2 min
05.	The clamp moves backwards and the strips are incubated into the 5 th well of the cartridge (<i>Conjugate</i>)	10 min
06.	The clamp moves backwards and the strips are incubated into the 4 th well of the cartridge (<i>Wash Buffer</i>)	2 min
07.	The clamp moves backwards and the strips are incubated into the 3 rd well of the cartridge (<i>Wash Buffer</i>)	2 min
08.	The clamp moves backwards and the strips are incubated into the 2 nd well of the cartridge (<i>Wash Buffer</i>)	2 min
09.	The clamp moves forwards and the strips are incubated into the 7 th well of the cartridge (<i>Substrate</i>)	10 min
10.	The clamp moves backwards and the strips are incubated into the 6 th well of the cartridge (<i>Wash Buffer</i>)	2 min

After completion of the process, the clamp moves to a central (stand-by) position in the Neptune Instrument to allow easy manipulation of the clamp. The instrument beeps and **"Finished test"** is displayed on the screen. Gently apply absorbent paper onto the basis of the strips to remove liquid from the bottom small cavity (sample loading hole) and allow the strips to dry for 30 minutes before interpretation of the results. The interpretation has to be done in the 24 hours following the test processing.

In case of use of the Neptune Scanner for help of results interpretation, please leave the processed strips attached to the clamp.

TEST DATA REGISTRATION

The test protocol can be downloaded by pressing the USB stick symbol and following the indications on the screen (Insert USB → Writing USB → Remove USB). This step is not obligatory but is highly recommended for traceability and regulatory matters.

9. RESULTS INTERPRETATION

The evaluation of the results is performed via the Neptune Quantification Software and scanning system.

More information on Neptube Quantification Software is available via your distributor or via our website www.diasource.be

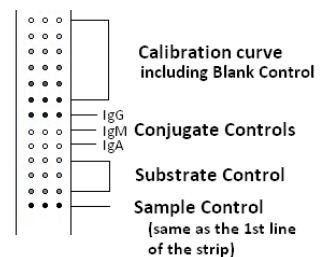
NB: Neptune Quantification Software is an interpretation supporting software only. The final clinical interpretation has always to be validated by a professional clinician or physician.

1. Remove the clamp from the Neptune Instrument. Leave the processed strips attached to the clamp.
2. Insert the clamp, the reactive side of the strips facing down, into the dedicated emplacement in the cover of the Neptune scanner.
3. Start scanning the strips using the Neptune Quantification software.
For detailed information about the Neptune Scanner and Neptune Quantification software please refer to the Manual of Use of your Neptune Quantification software.

9.1 Validity controls:

Before evaluating the antigen results, the Neptune Quantification software automatically checks the following points for validation of the test process:

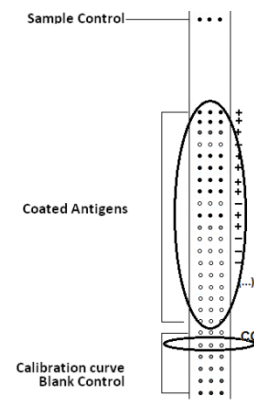
- **The Calibration curve (including blank control)** (6 triplicate lines, including blank control, of increasing colour intensity from top to bottom) must fit a pre-determined specific curve equation.
- **The Sample Controls** (2 triplicate lines, first and last on the strip) must have a minimum pre-determined colour intensity.
- **The Conjugate Controls** (3 triplicate lines, respectively IgG, IgM and IgA from top to bottom) must have a minimum pre-determined colour intensity, only for the respective conjugate specificity of the kit.
- **The Substrate Controls** (3 triplicate lines of increasing colour intensity from top to bottom) must fit a pre-determined linear regression.



9.2 Antigen results

Each strip contains an integrated **6 point standard (calibration) curve** with the values 0 (blank), 6, 12, 25, 50 and 100 U/ml; the Neptune Quantification software measures the mean colour intensity of each antigen triplicate, calculates the corresponding quantitative value from the calibration curve and refers to the pre-set cut-off value to evaluate the result. In the DIAspot Neptune MultiQUANT ANA¹⁹ IgG, the manufacturer's **recommended cut-off value is 6 U/ml** for all antigens.

Note: This 6 U/ml cut-off value corresponds to the colour intensity of the 2nd standard point of the calibration curve and is used by default by the Neptune Quantification. Nevertheless it may be adjusted for each antigen by the user, depending on his own ROC analysis (see Neptune Quantification's instructions of use).



POSITIVE RESULT:

A sample is considered positive for a specific antibody if the value of the corresponding Antigen dot is **higher than** the cut-off value.

In its principal results sheet, the Neptune Quantification software highlights the antigens for which the result is positive and indicates the calculated numeric value into brackets.

NEGATIVE RESULT:

A sample is considered negative for a specific antibody if the value of the corresponding Antigen dot is **lower than or equal** to the cut-off value.

Neptune Quantification results (U/ml)	Interpretation
< 6	Negative
6 – 12	Equivocal (*)
>12	Positive

* Low titers of auto-antibodies may occur in healthy patients. For this reason low positive results (results comprised between 6 to 12 U/ml), although valid, should be considered equivocal. Retesting of the patient, preferably by using a new sample, is therefore recommended. If the result is still equivocal on retesting, then other diagnostic tests and/or clinical information should be used to help determine the autoimmune status of the patient.

10. TEST PERFORMANCES

10.1 Reproducibility

Reference control samples were tested for each antibody in statistically relevant repetitions in a same run or over several runs for the calculation of intra- and inter-assay variation, respectively. In every case the intensity of the dots were within the specified range and standard deviations were less than 10 %.

Detailed analytical data are available upon request.

10.2 Sensitivity and Specificity

Characterized samples (confirmed positive or negative for specific antibodies by reference laboratories and/or methodologies) were assayed following the test instructions. Sensitivity and Specificity were calculated from the results generated by the Neptune quantification software at the cut-off value recommended by the manufacturer (6 U/ml).

SENSITIVITY:			
The percentage is established with the following calculation: True Positive results : True positive results + false negative results			
Antigen	True Positive Results	False Negative Results	Sensitivity
Nucleosome*	-	-	-
dsDNA	32	0	100%
Histones	31	0	100%
Sm	36	0	100%
RNP	43	0	100%
Sm/RNP	24	0	100%
SSA/Ro 60kD	69	1	99%
SSA/Ro 52kD*	-	-	-
SSB	54	0	100%
ScI-70	13	0	100%
RNA Polymerase III	4	0	100%
Ku	22	0	100%
PM-ScI 100	10	0	100%
Mi-2	20	0	100%
Jo-1	22	0	100%
CENP-A/B	16	0	100%
PCNA	13	0	100%
Ribosome P0	15	0	100%
DFS70	14	0	100%

SPECIFICITY:			
The percentage is established with the following calculation: True Negative results : True negative results + false positive results.			
Antigen	True negative results	False positive results	Specificity:
Nucleosome*	-	-	-
dsDNA	36	0	100%
Histones	132	0	100%
Sm	100	2	98%
RNP	93	2	98%
Sm/RNP	30	0	100%
SSA/Ro 60kD	78	0	100%
SSA/Ro 52kD*	-	-	-
SSB	93	1	99%
ScI-70	91	0	100%
RNA Polymerase III	264	0	100%
Ku	50	0	100%
PM-ScI 100	24	0	100%
Mi-2	50	0	100%
Jo-1	119	0	100%
CENP-A/B	97	1	99%
PCNA	34	0	100%
Ribosome P0	24	0	100%
DFS70	24	0	100%

For the antigens in grey, since no clearly characterized sample nor reference method is currently available, no values can reasonably be claimed.

11. TEST LIMITATIONS

1. A clinical diagnosis should not be made on the basis of a single in vitro diagnostic method only.
2. A complete clinical investigation, as well as other laboratory test results, should be considered to state a diagnosis, since no technique used alone can rule out the possibility of false-positive or false-negative results. In this respect, more particularly an indirect Immunofluorescence test, when applicable, should be performed in parallel with the determination of autoantibodies by automated immunodot technique, as Immunofluorescence is often considered as a gold reference screening technique in autoimmunity.
3. DIAsource and its authorised distributors shall not be liable for any damages resulting from a change or modification in the procedure indicated. The kit should be performed by trained technical staff only.
4. In any case, GLP should be applied with all general and individual regulations to the use of this kit.
5. DIAsource's liability shall in any event be limited to the replacement of the kit.

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Revision date : 2020-02-24



DIASpot MultiQUANT Neptune

ANA¹⁹ IgG

es

KAPDTANA19N

PROTOCOL : 02

IN VITRO DIAGNOSTIC

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1. USO

DIASpot MultiQUANT Neptune ANA¹⁹ IgG es un kit de Immunodot destinado a la detección de antígenos en suero humano de anticuerpos IgG contra Nucleosoma, dsDNA, Histonas, Sm, RNP (68kD/A/C), Sm/RNP, SSA/Ro 60kD, SSA/Ro 52kD, SSB, Scl-70, RNA Polymerasa III, Ku, PM-Scl 100, Mi-2, Jo-1, CENP-A/B, PCNA, Ribosoma P0 y DFS70.

Más información sobre la fuente/tipo de antígenos utilizados está disponible a través de su distribuidor o a través nuestro Departamento de soporte técnico : tech.support@diasource.be.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

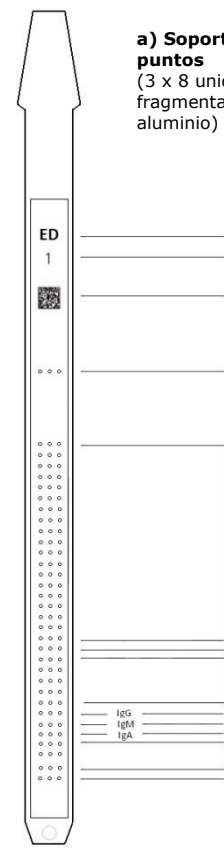
Este kit está diseñado para utilizarlo en el instrumento Neptune. Este test está basado en el principio del Enzimoimmunoensayo. Las tiras del ensayo se componen de una membrana fijada a un soporte específico de plástico. Durante el procedimiento del ensayo automatizado el instrumento Neptune secuencialmente incuba las tiras en los pocillos de los cartuchos con los reactivos listos para su uso. Brevemente: Las tiras son incubadas primero con sueros de pacientes diluidos. Los anticuerpos humanos, si están presentes, se enlazan a los antígenos específicos correspondientes en la membrana. Los anticuerpos no enlazados o en exceso se eliminan mediante lavado. Después de una incubación adicional en anticuerpos de cabra conjugados con AP contra IgG humana el conjugado enzimático se une a los complejos antígeno-anticuerpos. Después de eliminar el exceso de conjugado, por lavado, las tiras son incubadas finalmente en solución de sustrato. La actividad enzimática, si está presente, desarrolla unos puntos de color púrpura en los pocillos de la membrana. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra. Todos los resultados obtenidos son cuantitativos gracias a la curva de calibración de 6 puntos, incluyendo el control del blanco. En las tiras se utilizan diferentes tipos de controles (muestra, conjugado y sustrato). Su presencia valida el proceso total del ensayo (desde la adición de la muestra, cinética del sustrato a través de la especificidad/ reactividad del conjugado). Para la óptima precisión, todos los dots están adherido por triplicado en formato micro puntos, permitiendo el cálculo de la media y el coeficiente de variación de cada parámetro (antígenos, curva de calibración y controles).

3. CONTENIDO DEL KIT

Abreviaciones en orden alfanumérico:

AP = Fosfatasa Alcalina; BCIP = Fosfato de Indolil Bromo-Cloro; KCl = Cloruro de Potasio; MgCl₂ = Cloruro de Magnesio; MIT = MetilIsoTiazolona; NaCl = Cloruro Sódico; NaN₃: Azida Sódica; NBT = NitroAzul Tetrazolio; TBS = Tris Buffer Salino

a) Soporte de tiras con tiras de micro puntos
(3 x 8 unidades en soporte de plástico, fragmentables individualmente); sellados con aluminio)



ED
1

Referencia
Numero de tira

Código de barras 2D

Control de muestra

Antigenos

Control de blanco

Curva de Calibración

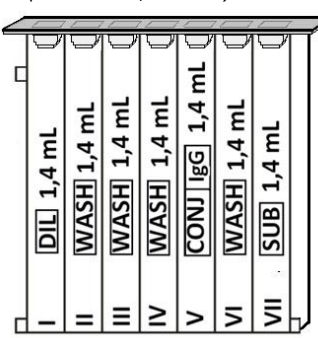
Control de conjugado
IgG
IgM
IgA

Control de sustrato

Control de muestra

b) Papel absorbente (para secar las tiras pt 8.1.16), junto con las tiras de micro puntos sellado en bolsa de aluminio

c) Cartucho CART
(24 unidades con 7 compartimientos; sellados)



Tampón de dilución
1ª posición, 1 x 1,4 ml (amarillo)
contiene: H₂O • TBS • NaCl • Tween • Conservante (MIT) • Dye • Antiespumante de emulsión

Tampón lavado
2ª, 3ª, 4ª y 6ª posición, 4 x 1,4 ml (incolore)
contiene: H₂O • TBS • NaCl • Tween • Conservante (MIT) • Antiespumante de emulsión

Conjugado
5ª posición, 1 x 1,4 ml (rojo)
contiene: H₂O • TBS • NaCl • KCl • MgCl₂ • AP-conjugado anti-humano de cabra IgG • Conservante (MIT) • Dye • Antiespumante de emulsión

Sustrato
7ª posición, 1 x 1,4 ml (solución Amarillo pálido)
contiene: H₂O • NaN₃ (0.05 %) • MgCl₂ • TBS • NBT Estabilizante • NBT • BCIP • Antiespumante de emulsión

DIL BUF

WASH SOLN

Ab AP

SUB

4. MATERIAL OBLIGATORIO O NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

Instrumento Neptune, Software cuantificación Neptune (mínima versión 3.0), micropipetas, guantes de laboratorio.

5. ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

El kit debe ser almacenado a una temperatura entre +2°C y +8°C. No congelar.

Después de abrir el kit los cartuchos no utilizados deben de almacenarse a 2-8°C protegidos de la luz, preferiblemente dentro de su caja original. Las tiras no utilizadas deben de guardarse en las bolsas suministradas selladas y almacenadas a 2-8°C preferiblemente dentro de la caja original. Cuando se almacena adecuadamente, todos los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada.

6. MEDIDAS DE SEGURIDAD (hacer case también del Manual del instrument Neptune)

Todos los reactivos son para uso en diagnostico in vitro y profesional. El equipo de prueba debe ser procesado solo por personal técnico cualificado.

El kit contiene componentes potencialmente peligrosos, por lo tanto debe de evitarse el contacto con la piel, ojos y mucosas.

Las muestras de paciente deben ser manejadas con cuidado por existir un peligro de infección.

Eliminación de residuos: Las muestras de pacientes y las tiras utilizadas deben de tratarse como desechos infecciosos. Otros reactivos no deben de recogerse por separado a no ser que lo indiquen los reglamentos oficiales.

DIASource. y sus distribuidores autorizados no se hacen responsables de los daños indirectamente provocados por el cambio o modificación del procedimiento.

En cualquier caso, el GLP se debe de aplicar todas las normas generales y particulares para el uso de éste kit.

7. RECOGIDA DE MUESTRAS, MANEJO Y ALMACENAJE

Las muestras de sangre pueden recogerse en tubos secos o tubos con EDTA, heparina o citrato. Después de la separación las muestras de suero o plasma se pueden guardar 2-8°C durante tres días. Para periodos más largos deben de ser congeladas a -20°C. Evitar congelar y descongelar varias veces. Después de descongelar agitar las muestras antes de ser utilizadas para asegurar su homogeneidad.

8. PROCEDIMIENTO

INFORMACIÓN BÁSICA, MANEJO Y CONSEJOS:

PRINCIPIO DEL ENSAYO:

Después de la carga manual de las tiras y los cartuchos de reactivos, la incubación y los pasos de lavado se procesan automáticamente por el instrumento *Neptune* el cual asegura la circulación eficiente de los fluidos sobre las tiras por una agitación de arriba hacia abajo en los pocillos de los cartuchos de reactivo. El procedimiento se realice a temperatura ambiente.

TIRAS descripción:

Parte reactiva (parte frontal): los antígenos recubren las tiras, las cuales presentan unos puntos azulados débiles. Esta coloración asegura que los antígenos han sido impregnados en la membrana. La coloración desaparece durante el procedimiento. La parte frontal también muestra el número de tira y el código de barras 2-dimensional cuadrado para la rastreabilidad de las tiras después de retirar las tiras del instrumento *Neptune* al final del ensayo.



Parte no-reactiva (reverso): las tiras muestran información alfanumérica y código de barras para la identificación del tipo de tira y número de lote por parte del instrumento *Neptune*.



Las tiras deben de ser insertadas manualmente en la abrazadera antes de iniciarse (ver preparación de la prueba, pt 8.1.4). Durante esta operación no toque la zona de la membrana de las tiras con los dedos. Utilizar siempre guantes y utilizar las partes de plástico (soporte de la tira) para el manejo o manipulación.

CARTUCHOS DE REACTIVO descripción: (ver imagen en página 1)

Los cartuchos de reactivo se componen de 7 diferentes pocillos rellenos de reactivos listos para su uso. Los cartuchos van sellados (todos los pocillos están herméticamente separados) con aluminio que se puede retirar antes del inicio del test. Una vez abiertos manejar los cartuchos con cuidado con el fin de evitar el derrame y la contaminación de pocillo a pocillo.

La parte posterior de los cartuchos están etiquetados con la información alfanumérica y un código de barras para la identificación del tipo de cartucho y número de lote por parte del instrumento *Neptune*.

Los cartuchos pueden ser cargados manualmente en la posición asignada para los cartuchos antes de iniciar el proceso automatizado (ver la preparación del test, pt 8.1.10). La parte frontal y posterior de los cartuchos tienen respectivamente, un fondo triangular y dos (inferior y superior) cuadrados de plástico para asegurar la posición y orientación dentro de su soporte.

TIRAS/CARTUCHOS asociaciones

Las tiras y cartuchos del mismo kit comparten el mismo número de lote y se dedican a ser utilizados en pares de los mismos números de lotes asociados. En caso de no asociación, una tira y un cartucho de diferente número de lote es detectado por el instrumento *Neptune* como inválido y se para el proceso.

En el momento en cada pareja de tira/cartucho es válida, el instrumento *Neptune* puede procesar diferentes kits a la vez; sin embargo solo se pueden procesar a la vez kits que tengan el mismo número de protocolo (incubación y secuencia de ensayo) (observar el número de protocolo indicado debajo de la referencia del kit en la primera página de las instrucciones de uso).

8.1 Preparación del ensayo

- Conseguir que todos los componentes del kit estén a temperatura ambiente (+18°C a 25°C) antes de ser utilizados.
- La lista de trabajo (obtenida desde el software cuantificación *Neptune* o externa) debería de prepararse con el fin de facilitar la carga correcta de las tiras y los cartuchos asociadas a sus muestras.
- Asegurarse que el cartucho se coloca correctamente en su posición del instrumento *Neptune*.
- Asegurarse que el instrumento *Neptune* está conectado

Los siguientes pasos resumen la secuencia de los pasos de carga y preparación del instrumento *Neptune*, tiras de test, cartuchos de reactivos y muestras de paciente antes de iniciar el test. Para información más detallada o en caso de cualquier problema e uno de los siguientes pasos consultar el Manual de Usuario del instrumento *Neptune*.

1. Conectar el instrumento *Neptune* y esperar unos segundos hasta que la fecha y la hora aparezcan en la pantalla táctil.
2. Confirmar la fecha y hora correctas presionando ✓ en la pantalla táctil (la primera vez o para resetear, consultar el Manual de Usuario del *Neptune*) → “Inicializar?” aparece en la pantalla.
3. Confirmar inicialización presionando ✓ en la pantalla táctil → el brazo horizontal se mueve hacia la posición central automáticamente (posición de reposo) → “Cargar tiras (24”) aparece en la pantalla
4. (No confirmar el número de tiras en este paso). Retire la abrazadera del brazo tirando hacia arriba y cargue las tiras que se van a utilizar: manejar la pinza con la cara numerada hacia arriba (posición abierta) y cargar las tiras, también con la numeración (reactivo) hacia arriba, por deslizamiento de la parte superior de plástico (lengua) en los orificios de la abrazadera. Presionar suavemente para asegurar que la lengüeta de plástico ha alcanzado el extremo inferior del agujero

Notas:

- Colocar las tiras a partir de la posición 1 de la abrazadera (parte izquierda) y no dejar espacios entre las tiras!
 - Después descargar las tiras comprobar el alineamiento vertical, horizontal y lateral de las tiras. Cualquier mal alineamiento debe de ser corregido antes de colocar la abrazadera en el brazo.
 - Tenga precaución: cualquier parte de plástico, remanente después de romper los soportes individuales de las tiras, puede dificultar el proceso en el instrumento y/o en la lectura en el *Neptune Scanner*, remuévalos con unas tijeras.
5. Vuelva a colocar la abrazadera en su emplazamiento presionando suavemente hacia
 6. Indicar el número de tiras cargadas utilizando la flecha hacia arriba o hacia abajo en la pantalla táctil.
 7. Confirmar el número de tiras cargadas presionando ✓ en la pantalla táctil → El brazo horizontal se mueve automáticamente y se posiciona sobre los orificios de alineación de los cartuchos → “Chequear alineamiento” aparece en la pantalla
 8. Utilice la función “Paso a paso” para comprobar la perfecta alineación de las tiras: presionar suavemente la flecha hacia abajo hasta que las tiras entren en el orificio de los cartuchos. Si el alineamiento es correcto las tiras no deben de tocar las paredes de los orificios.

Nota: en caso de mal alineamiento (roce de las tiras con el orificio del cartucho), remitirse al Manual de Usuario del instrumento *Neptune*.

9. Confirmar el alineamiento correcto de las tiras presionando ✓ en la pantalla táctil → El instrumento *Neptune* introduce las tiras en los orificios de alineamiento y lee los códigos de barras de las tiras → después de leer los códigos de barras, aparece “Cargar reactivos” en la pantalla táctil.

Nota: en caso de fallo en la lectura de una o más tiras (una LED intermitente marcará la posición no leída), remitirse al Manual de Usuario del instrumento.

10. Desprecintar los cartuchos de reactivo e insertarlos con el código de barras hacia dentro en las respectivas muescas destinadas a soportar los cartuchos.
11. Confirmar la carga presionando ✓ en la pantalla táctil → El instrumento *Neptune* lee los códigos de barras de los cartuchos y chequea la correcta asociación con las tiras → después de la lectura de los códigos de barras el número de tiras aparece en pantalla (tiras validadas/cartuchos asociados).

Nota: en caso de fallo en la lectura de uno o más cartuchos o detección errónea de asociación tira/cartucho (la LED correspondiente parpadeara) remitirse al Manual de Usuario del instrumento.

12. Confirmar el número de tiras presionando ✓ en la pantalla táctil → el número de protocolo identificado en el código de barras aparece en la pantalla (**ID Protocolo xx.**).
13. Confirmar el número de protocolo presionando ✓ en la pantalla táctil → "**Por favor, cerrar la tapa.**" Aparece en la pantalla.
14. Cerrar la tapa del instrumento *Neptune* y confirmar que se ha cerrado presionando ✓ en la pantalla táctil → El instrumento procede a efectuar el primer lavado (pre-tratamiento) incubando las tiras en el 2nd pocillo de los cartuchos (1 minuto) → al final del paso de hidratación, "**Por favor, abrir la tapa.**" Aparece en la pantalla.
15. Abrir la tapa del instrumento Neptune y confirmar presionando ✓ en la pantalla táctil → el brazo horizontal se mueve automáticamente hacia el frente del instrumento y colocando las tiras de forma oblicua → "**Secar tiras**" aparece en la pantalla.
16. Secar las tiras con un papel absorbente suavemente en la parte inferior de las tiras (orificio donde se dispensa la muestra).
17. Confirmar el secado presionando ✓ en la pantalla táctil → "**Aplicar muestras**" aparece en la pantalla.
18. Dispensar las muestras pipeteando 10 µl de suero/plasma de paciente en el orificio inferior de las tiras.
Nota: Si prefiere, pueden dispensarse los 10µl del suero directamente en el Buffer de Dilución ("Celda 1") del cartucho. Esta operación puede ser realizada en cualquier momento abriendo el cartucho correspondiente (ver Punto 8.1.10).
19. Confirmar la carga de las muestras presionando ✓ en la pantalla táctil → "**Por favor, cerrar la tapa**" aparece en pantalla.
20. Cerrar la tapa del instrumento Neptune y confirmar que se ha cerrado presionando ✓ en la pantalla táctil → El *Neptune* empezara automáticamente el proceso según la secuencia de pasos (**Protocolo 02**):

8.2 Procedimiento

Paso	Descripción	Tiempo empleado
01.	Las tiras son incubadas en el 1 st pocillo del cartucho (<i>Tampón de dilución</i>). Al entrar en contacto con el líquido de los y la agitación, las muestras de los pacientes pocillos (ver 8.1.18) se liberan de la parte inferior de la tira y se diluyen en el tampón.	30 min
02.	El brazo se mueve hacia adelante y las tiras son incubadas en el 2 nd pocillo del cartucho (Tampón de lavado)	2 min
03.	El brazo se mueve hacia adelante y las tiras son incubadas en el 3 rd pocillo del cartucho (Tampón de lavado)	2 min
04.	El brazo se mueve hacia adelante y las tiras son incubadas en el 6 th pocillo del cartucho (Tampón de lavado)	2 min
05.	El brazo se mueve hacia atrás y las tiras son incubadas en el 5 th pocillo del cartucho (Conjugado)	10 min
06.	El brazo de mueve hacia atrás y las tiras son incubadas en el 4 th pocillo del cartucho (Tampón de lavado)	2 min
07.	El brazo de mueve hacia atrás y las tiras son incubadas en el 3 rd pocillo del cartucho (Tampón de lavado)	2 min
08.	El brazo se mueve hacia atrás y las tiras son incubadas en el 2 nd pocillo del cartucho (Tampón de lavado)	2 min
09.	El brazo se mueve hacia adelante y las tiras son incubadas en el 7 th pocillo del cartucho (Sustrato)	10 min
10.	El brazo se mueve hacia atrás y las tiras son incubadas en el 6 th pocillo del cartucho (Tampón de lavado)	2 min

Después de completado el proceso, el brazo se mueve hasta la posición central (reposo) del instrumento Neptune para permitir la fácil manejo de la pinza. El instrumento emite un pitido y "**Test finalizado**" aparece en pantalla.

Aplicar suavemente papel absorbente en la parte inferior de las tiras (cavidad donde se a dispensado la muestra) y dejar secar las tiras durante 30 minutos antes de interpretar los resultados. La lectura de interpretación debe ser realizada dentro de las 24 horas de procesado el test.

En caso de utilizar el Neptune para ayudar en la interpretación de resultados, dejar las tiras procesadas en la pinza.

REGISTRO DE DATOS

El protocolo del test se puede descargar pulsando el símbolo de una memoria USB y siguiendo las indicaciones de la pantalla (Insertar USB → Escribir USB → Retirar USB). Este paso no es obligatorio pero recomendable para la trazabilidad asuntos regulatorios.

9.INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La evaluación de los resultados se realiza a través del Software cuantificación Neptune y del escáner.

Más información sobre software para cuantificación está disponible a través del distribuidor local o a través nuestro Departamento de soporte técnico tech.support@diasource.be.

NB: El Software cuantificación Neptune es solo de soporte para la interpretación. La interpretación clínica final debe ser validad siempre por un clínico o profesional experto.

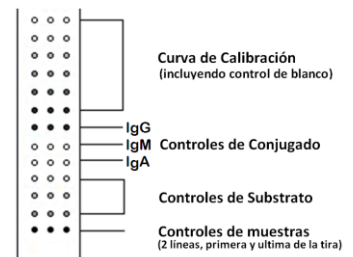
1. Quitar la pinza del instrumento Neptune. Dejar las tiras procesadas cogidas a la pinza.
2. Insertar la pinza, las tiras reactivas hacia abajo, en el emplazamiento dedicado en la tapa del escáner Neptune Scanner.
3. Iniciar el escaneo de las tiras utilizando el Software cuantificación Neptune.

Para información detallada sobre el Neptune Scanner y el Software cuantificación Neptune remitirse al Manual de usuario del Software cuantificación Neptune.

9.1 Validación de controles:

Antes de evaluar los resultados de los antígenos, el Software cuantificación Neptune chequea automáticamente los siguientes puntos para validar el procesos del ensayo:

- **Curva de Calibración (incluyendo control de blanco)** (6 líneas de triplicado, incluyendo control de blanco, incrementando la intensidad de color desde arriba abajo) debe ajustar una ecuación de una curva específica predeterminada
- **Controles de muestras** (2 líneas triplicadas, primera y última de la tira) debe tener una mínima intensidad de color mínimo predeterminada
- **Control de Conjugado** (3 líneas triplicadas, IgG, IgM and IgA respectivamente desde arriba a abajo) debe de tener una intensidad mínima de color, solo para el conjugado específico del kit.
- **Control del Substrato** (3 líneas triplicadas incrementando el color desde arriba a abajo) debe ajustar una regresión lineal predeterminada.



9.2 Resultados de los antígenos

Cada tira contiene una **curva de calibración de 6 puntos** integrada con valores de 0 (blanco), 6, 12, 25, 50 y 100 U/ml; El software cuantificación Neptune mide la media de la intensidad de color de cada triplicado de los antígenos, calculando el correspondiente valor cuantitativo a partir de la curva de calibración dándose un resultado en función de un punto de corte preestablecido. Para el DIASpot MultiQUANT Neptune ANA19 IgG, el fabricante **recomienda un valor de corte de 6 U/ml** para todos los antígenos.

Nota: Este valor de corte de 6 U/ml corresponde a la intensidad de color del 2nd punto de la curva de calibración y es utilizado por defecto por el cuantificación Neptune. Sin embargo, puede ser ajustado por el usuario para cada antígeno, dependiendo de sus análisis ROC (ver las instrucciones de uso del cuantificación Neptune).

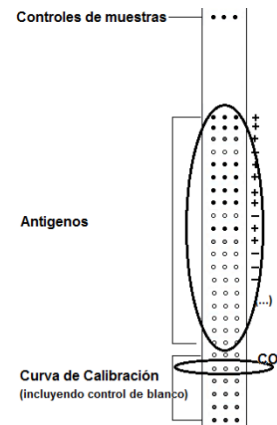
RESULTADO POSITIVO:

Una muestra será considerada positiva para un específico anticuerpo si el valor de antígenos microdot correspondiente son **más alto** que el valor de corte.

En su hoja de resultados, el software cuantificación Neptune destaca los antígenos que han resultado positivos indicando el valor numérico que ha calculado el software.

RESULTADO NEGATIVO:

Una muestra es considerada negativa para un anticuerpo específico si el valor de antígenos microdot correspondiente son **igual o más bajo** que el valor de corte.



Cuantificación Neptune resultados (U/ml)	Interpretación
< 6	Negativo
6 - 12	Dudoso o Equívoco (*)
>12	Positivo

* Bajos niveles y títulos de auto-anticuerpos en pacientes sanos pueden ocurrir o mostrarse. Por esa razón, resultados positivos débiles (resultados comprendidos entre los 6 a 12 U/ml), a pesar de poder ser válidos, deben considerarse equívocos o dudosos. Es recomendable repetir el test de estos pacientes usando nuevas muestras de los mismos. Si los resultados siguen siendo equívocos o dudosos, entonces otro método y/o información clínica deben ser usados para ayudar en la determinación del estado de autoinmunidad de los pacientes.

10. CARACTERÍSTICAS DEL TEST

10.1 Reproducibilidad

Las muestras de control fueron testadas para cada anticuerpo en repeticiones estadísticamente relevantes en el mismo ensayo o en diferentes ensayos para el cálculo de las variaciones intra y inter ensayo respectivamente. En cada caso la intensidad de los microdots estaban dentro del rango especificado y las desviaciones estándar fueron menores del 10%.

Los datos analíticos detallados están disponibles previa petición.

10.2 Sensibilidad y Especificidad

Muestras caracterizadas y presentadas (positivos o negativos confirmados para antígenos específicos por laboratorios y/o metodologías de referencia) fueron procesados siguiendo las instrucciones del test. Sensibilidad y Especificidad fueron calculados de los resultados generados por el software cuantificación Neptune al valor de corte de reacción de fabricante (6 U/ml).

SENSIBILIDAD:			
El porcentaje se establece con el siguiente cálculo: Resultados verdaderos positivos : Resultados verdaderos positivos + falsos negativos			
Antígeno	Positivos verdaderos	Falsos Negativos	Sensibilidad
Nucleosoma*	-	-	-
dsDNA	32	0	100%
Histonas	31	0	100%
Sm	36	0	100%
RNP	43	0	100%
Sm/RNP	24	0	100%
SSA/Ro 60kD	69	1	99%
SSA/Ro 52kD*	-	-	-
SSB	54	0	100%
Scl-70	13	0	100%
RNA Polimerasa III	4	0	100%
Ku	22	0	100%
PM-Scl 100	10	0	100%
Mi-2	20	0	100%
Jo-1	22	0	100%
CENP-A/B	16	0	100%
PCNA	13	0	100%
Ribosoma P0	15	0	100%
DFS70	14	0	100%

ESPECIFICIDAD:			
El porcentaje se establece con el siguiente cálculo: Resultados negativos verdaderos: Resultados verdaderos negativos + falsos positivos			
Antígeno	Negativos verdaderos	Falsos Positivos	Especificidad
Nucleosoma*	-	-	-
dsDNA	36	0	100%
Histonas	132	0	100%
Sm	100	2	98%
RNP	93	2	98%
Sm/RNP	30	0	100%
SSA/Ro 60kD	78	0	100%
SSA/Ro 52kD*	-	-	-
SSB	93	1	99%
Scl-70	91	0	100%
RNA Polimerasa III	264	0	100%
Ku	50	0	100%
PM-Scl 100	24	0	100%
Mi-2	50	0	100%
Jo-1	119	0	100%
CENP-A/B	97	1	99%
PCNA	34	0	100%
Ribosoma P0	24	0	100%
DFS70	24	0	100%

Para los antígenos **en gris**, dado que no que hay en el momento un método de referencia o la muestra no presenta un resultado claramente definido, no es posible ni recomendable el presentar valores en dichos resultados.

11. LIMITACIONES DEL TEST

- Un diagnóstico clínico no debe realizarse basado en un solo método IVD usado.
- Una completa investigación, como otros resultados de tests de laboratorio deben ser considerados para establecer un diagnóstico, desde el momento en que ningún método o técnica debe ser usada en forma única para regular la posibilidad de resultados falso-positivos o falso-negativos. Al respecto y más particularmente un test de inmuno fluorescencia indirecta, cuando es aplicable, debe ser realizado en paralelo con la determinación de los anticuerpos por DIASpot Neptune, dado que muy comunmente el método de inmuno fluorescencia es considerado como el método de referencia o "estándar de oro" en el screening de autoinmunidad.
- DIASource y sus distribuidores autorizados, no son responsables, por daños algunos generados como resultado de cambios o modificaciones en el procedimiento indicado. El kit debe ser usado solamente por personal técnico debidamente entrenado.

4. En cualquier caso, las BPL (GLP) que regulan todos los procedimientos, deben ser aplicadas en todo caso particular o general en que se use este kit.
5. La responsabilidad de la empresa DIAsource (o sus distribuidores autorizados) está limitada en cualquier caso únicamente hasta el reemplazo del kit en cuestión.

Última revisión : 2020-02-24