DIASpot Neptune Liver[5] IgG

Order Code: KAPDTLI5N

Neptune Protocol: 02

1. INTENDED USE

DIASpot Neptune Liver[5] IgG is an Immunodot kit intended for the detection, in human sera only, of IgG autoantibodies against the antigens M2/nPDC, LKM1, LC1, SLA and F-actin.

This kit is intended to confirm results of patterns obtained by immunofluorescence, the screening and reference method in autoimmunity; the kit is intended as an aid in the diagnosis of several autoimmune diseases (for more details, see 11.5 Autoantibodies diagnostic values).

The test is intended for a large, routine population. This kit is strictly reserved for professional use in clinical analysis laboratories. This kit is strictly foreseen as an automated test and can only be used in a Neptune Instrument.

Detection of the different IgG autoantibodies can be either qualitative (see point 10.1) or semi-quantitative (see point 10.2).
For a semi-quantification of the test results, it is necessary to use the Neptune Scanner system and the Neptune Quantification Software. This system is not included in the Neptune Instrument.

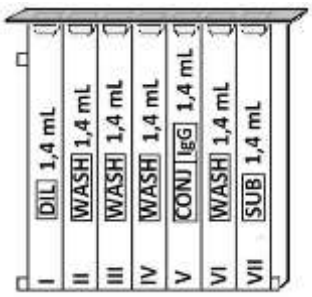
2. PRINCIPLE OF THE TEST

This kit and all its components are intended to be performed exclusively on the Neptune Instrument.
The test is based on the principle of an Enzyme Immunoassay. The 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.
The kit is composed of 24 single-use tests.

3. KIT CONTENTS

Prior to any use of the kit, please check that all the items listed are present. Please also check if the characteristics of the product are corresponding to those described hereafter.
If one of the items is missing or damaged, please do not use the kit and contact your distributor.

3.1 COMPONENTS

		STRIP	CARTRIDGE
Strips	3 x 8 units on plastic supports breakable individually sealed in aluminium pouch. Each strip is for single use. <u>7 dots on each</u>: 1 positive control (RC) 5 antigens 1 negative control (CO)		 **Documents:** Instructions for Use (IFU), Certificate of Analysis (CoA)
Cartridge	24 units having each 7 compartments; sealed. Each cartridge is for single use		
Diluent buffer	I[st] position, 1 x 1,4 ml (yellow) *contains* *H_2O • TBS • NaCl • Tween • BSA • Preservatives • dye • antifoam emulsion*		
Wash buffer	IInd, IIIrd, IVth and VIth position, 4 x 1,4 ml (colourless) *contains* *H_2O • TBS • NaCl • Tween • Preservatives • antifoam emulsion*		
Conjugate	V[th] position, 1 x 1,4 ml (red) *contains* *H_2O • TBS • NaCl • KCl • $MgCL_2$ • AP-conjugated goat anti-human IgG • Preservatives • dye • antifoam emulsion*		
Substrate	VIIth position, 1 x 1,4 ml (pale yellow solution) *contains* *H_2O • Preservatives • $MgCL_2$ • TBS • NBT stabilizer • NBT • BCIP*		

Abbreviations in alphabetic order:
AP = Alkaline Phosphatase; BCIP = Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphate; BSA = Bovine Serum Albumin; KCl = Potassium Chloride; $MgCl_2$ = Magnesium Chloride; NaCl = Sodium Chloride; NBT = NitroBlue Tetrazolium; TBS = Tris Buffer Saline

For more information on the composition and concentration of the active ingredients used, please refer to the MSDS available on request or on www.diasource-diagnostics.com.

Symbols used on kit labels

	Consult instructions for use	CE 2797	CE Mark + Notified Body
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device	Σ 24	For 24 uses
2°C 8°C	To be stored from 2-8°C	REF	Reference
LOT	Batch Number		To be protected from direct sunlight
	Use-by date		Manufacturer
CART	Cartridge		Do not re-use
STRIP	Strip		Caution

3.2 Antigens used

M2/nPDC	E1, E2, E3 subunits of Pyruvate Dehydrogenase Complex (purified from bovine heart)
LKM1	Cytochrome oxydase P450 2D6 (liver-kidney microsome type I antigen), Full length (recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells)
LC1	Formiminotransferase cyclodeaminase (liver cytosol type I antigen) (recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells)
SLA	Soluble Liver Antigen (recombinant, human, expressed in E.coli bacterial cells)
F-actin	In-vitro polymerized actin filaments (prepared from purified G-actin (rabbit skeletal muscle)

3.3 Reactive ingredients

Substance	**Origin**	**Intend purpose in LIVER kits**	**Concentration in LIVER kits**	**Purity**
Goat anti-human IgG-alkaline phosphatase	Animal (Goat)	Secondary antibody (detection antibody) in conjugate buffer	< 0,1 µg/ml in conjugate buffer	Unknown. No antibody is detectable to non-immunoglobulin serum components.
M2/nPDC antigen	Purified from bovine heart	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One M2/nPDC spot = 0,5µl on each strip	>80%
LKM1 antigen	Recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One LKM1 spot = 0,5µl on each strip	>80%
LC1 antigen	Recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One LC1 spot = 0,5µl on each strip	>80%
SLA antigen	Recombinant, human, expressed in E.coli	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One SLA spot = 0,5µl on each strip	>80%
F-actin antigen	Prepared from purified G-actin rabbit skeletal muscle	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One F-actin spot = 0,5µl on each strip	>80%
Protein L	Bacterial (from Peptostreptococcus magnus)	Reactive (positive) control	0,01 mg/ml One RC spot = 0,5µl on each strip	>95%
Streptavidin-Alkaline Phosphatase	Bacterial (from Streptomyces avidinii)	Cut-off (negative) control	< 0,1 µg/ml One CO spot = 0,5µl on each strip	Unknown.
NBT-BCIP	Synthetic (chemical substance	Substrate for alkaline phosphatase	0,2 mg/ml	≥ 98%

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Neptune Instrument:

The Neptune Instrument is an instrument that performs the various steps of incubation and washing of Diasource's immunodot strips, from the deposit of the sample to the final colour development. The maximum capacity is of 24 strips which are incubated simultaneously. Each strip is associated with a cartridge containing the various reagents making it possible to carry out the test. The Neptune Instrument has a barcode reader which controls the correct association between a strip and its cartridge.
Prior training is strongly recommended (see your distributor).
Please consult The User Manual before using the Neptune Instrument.

The Neptune Scanner and Neptune Quantification Software:

The Neptune Scanner and Neptune Quantification Software are intended for reading test results of Diasource's immunodot strips. The Neptune Quantification Software and Neptune Scanner have to be used in combination.
The scanner has been specifically developed for the reading of the strips with this design. Based on the image of the scanned strips, the Neptune Quantification Software converts the intensity of each dot/line into a numerical value (the numerical scale is based on a greyscale). Results are expressed in arbitrary units (from 0-100). 1-24 strips can be read.
Prior training is strongly recommended (see your distributor).
Please contact your distributor do obtain the latest version of the Neptune Quantification Software.
Please consult The User Manual before using the Neptune Scanner and Neptune Quantification Software.

***Other Material**:* Micropipettes, absorbent paper, protective equipment (see point 6).

5. STORAGE

The test kit must be stored at a temperature between +2°C to +8°C throughout its validity period (see expiration date on the kit). 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 must 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

1. All reagents are for in vitro diagnostic and professional use only. The test kit should be processed by trained technical staff only.
2. The reagents in the kit are considered as <u>not</u> dangerous, as the concentrations of potentially dangerous chemicals are below the thresholds specified by European regulations:

Name	**CAS**	**EINECS**	**Concentration in strip**	**Classification according to Regulation EC 1272/2008 Significance H Phrases**
Cellulose Nitrate	9004-70-0	-	< 5 %	Flam. Sol. 1 H228

Annex VI to Regulation (EC) No 1272/2008: Index N°: 603-037-00-6; Commission Regulation (EU) 2015/830; 3.2.1

Name	**CAS**	**EINECS**	**Concentration in mixture**	**Classification (in concentrated form) according to Regulation EC 1272/2008 Significance H Phrases**
MIT:	55965-84-9	-	< 0,0015 %	Acute Tox. 2 H330 Acute Tox. 2 H310 Acute Tox. 3 H301 Skin Corr. 1 C H314; C ≥ 0,6% Eye Dam. 1 H318; C ≥ 0,6% Skin Sens. 1 A H317 ; C ≥ 0,0015% A Aquatic Acute 1 H400 Aquatic Chronic 1 H410

Annex to Commission Regulation (EU) 2018/1480; Index Number: 613-167-00-5 ; Commission Regulation (EU) 2015/830; 3.2.1

Name	**CAS**	**EINECS**	**Concentration in mixture**	**Classification (in concentrated form) according to Regulation EC 1272/2008 Significance H Phrases**
NaN_3	26628-22-8	247-852-1	< 0.1 %	Acute tox. 2 H300 Acute tox. 1 H310 STOT RE 2 H373 Aquatic acute 1 H400 Aquatic chronic, 1 H410

Annex VI to Regulation (EC) No 1272/2008: Index Number: 011-004-00-7; Commission Regulation (EU) 2015/830; 3.2.1

Name	CAS	EINECS	Concentration in mixture	Classification (in concentrated form) according to Regulation EC 1272/2008 Significance H Phrases
NBT	298-83-9	206-067-4	< 0,01%	Acute tox. 4 H302

Nevertheless, these chemicals are toxic in concentrated form. Therefore, contact with the skin, eyes or mucous membranes should be avoided by using suitable individual protection (gloves, laboratory coat, goggles). As with any chemical containing specific hazards, the product/components of the product should only be handled by qualified personnel and with the necessary precautions.

3. Patient samples should be handled as if they could transmit infectious diseases; they therefore require suitable protection (gloves, laboratory coat, goggles). In any case, GLP should be applied with all the general or individual safety rules in force.
4. Waste disposal: Patient samples, incubated test strips and used cartridges should be handled as infectious waste. The boxes and other containers do not need to be collected separately, unless stated otherwise in official regulations.
5. The device is containing substances from animal, human, and bacterial origins (cfr 3.3) at very low concentration. All these substances were selected in order to not contain any microbial or transmissible agents and are non-toxic at the concentration used in the device. Nevertheless, laboratory good practice at user site (glasses, gloves) is necessary.

7. RECOMMANDATIONS

1. Diasource and its authorized distributors cannot be held responsible for damages caused indirectly or due to a change or modification in the indicated procedure, an improper use of the kit and / or the use of an incomplete or damaged kit. The use of this kit is reserved for qualified technical personnel only.
2. Diasource's responsibility is limited in all cases to the replacement of the kit.
3. In the event of a serious incident (injury, deterioration in health, or death) with this IVD device, please report it immediately to the manufacturer (see address below) and to the competent authority in your country.

8. SAMPLE COLLECTION, HANDLING AND STORAGE

Sera with particles should be centrifuged at low speed. Blood samples should be collected in dry tubes. Please avoid using a pool of different sera, as this can lead to inconsistent results (see point 10.4). After separation, the serum samples should be used immediately or aliquoted and stored at 2-8 ° C (for maximum 14 days) or frozen at -20°C (for longer storage periods, maximum 13 months). Repeated freezing/ thawing cycles of the samples must be at a maximum of 10 cycles.

9. ASSAY PROCEDURE

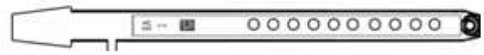
BASIC INFORMATION, HANDLING AND TIPS:

TEST PROCESS principle:

After the manual loading of the strips and reagent cartridges, the incubation and washing steps are automatically processed by the *Neptune Instrument;* the continuous up and down agitation of the strips in the wells of the ready-to-use reagent cartridges ensures an efficient circulation of the fluids over the strips. The whole test procedure is run at room temperature.

Description of the STRIPS:

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 9.1 and 9.2 *Test Preparation* hereafter). 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.

Description of the CARTRIDGES: **(see image 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 must 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 9.1 and 9.2 *Test Preparation* hereafter). 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.

Description of the CONTROLS:

The **Positive Control or RC (Reaction Control)** consists of a protein (protein L) fixing all the immunoglobulins present in the test sample. If the test has been carried out correctly, this control will show a colouring at the end of the test (with an intensity depending on the effective concentration of immunoglobulins in the sample).

The absence of any colouring of this dot at the end of the test may indicate that the sample has not been pipetted on the strip (see 10.4 *Troubleshooting*).

The **Negative Control or CO (Cut-Off Control)** consists of a protein (streptavidin – alkaline phosphatase) reacting with the enzymatic substrate and with certain constituent elements of the tested sample. If the test has been carried out correctly, this control is coloured at the end of the test, with a signal depending on the kinetics of the substrate and the characteristics of the sample. The intensity of this control serves as a threshold value for the final interpretation of the results (see 10 *INTERPRETATION OF RESULTS*).

STRIPS/CARTRIDGES association

The strips and cartridges of a same test kit share the same lot number and are dedicated to being associated in lot-specific pairs. Do not associate 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 long 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).

9.1 Test preparation on Neptune Instrument

Before any usage of the Neptune Instrument, please refer to the manual of use supplied with the instrument.

- Allow all kit components to equilibrate at room temperature (+18°C to +25°C) before use.
- A working list (either edited from Neptune Quantification 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 **V** 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 **V** 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 **V** 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 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 **V** 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 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 **V** on the touch screen → the Neptune Instrument reads the barcodes of the cartridges 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 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 **V** 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 **V** 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 **V** 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 **V** 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 **V** on the touch screen → "***Apply samples***" is displayed on the screen.
18. Apply samples by pipetting 10 µl of patient serum 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 9.1.10).
19. Confirm samples' loading by pressing **V** on the touch screen → "***Please close cover***" is displayed on the screen.
    Close the cover of the Neptune Instrument and confirm closing by pressing **V** on the touch screen → the Neptune Instrument starts the test automatically by proceeding the steps sequence of the protocol (see 9.3). 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.
20. 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 must 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.

9.2 Test Processing (Protocol 02 for all Diasource immunodot kits on Neptune Instrument):

Step	Description	Processing time
01.	The strips are incubated into the 1st well of the cartridge (*Diluent Buffer*). Upon contact with the liquid in the wells and agitation, the pre-loaded patients' samples (see 9.1.18) 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 2nd well of the cartridge (*Wash Buffer*)	2 min
03.	The clamp moves forwards and the strips are incubated into the 3rd well of the cartridge (*Wash Buffer*)	2 min
04.	The clamp moves forwards and the strips are incubated into the 6th well of the cartridge (*Wash Buffer*)	2 min
05.	The clamp moves backwards and the strips are incubated into the 5th well of the cartridge (*Conjugate*)	10 min
06.	The clamp moves backwards and the strips are incubated into the 4th well of the cartridge (*Wash Buffer*)	2 min
07.	The clamp moves backwards and the strips are incubated into the 3rd well of the cartridge (*Wash Buffer*)	2 min
08.	The clamp moves backwards and the strips are incubated into the 2nd well of the cartridge (*Wash Buffer*)	2 min
09.	The clamp moves forwards and the strips are incubated into the 7th well of the cartridge (*Substrate*)	10 min
10.	The clamp moves backwards and the strips are incubated into the 6th well of the cartridge (*Wash Buffer*)	2 min

10. INTERPRETATION OF RESULTS

A visual (qualitative) interpretation of the results is possible, however the use of the Neptune Scanner and the Neptune Quantification Software is generally recommended for more precision and for a semi-quantitative interpretation.

IMPORTANT NOTICE: The positivity of all parameters of this kit is NOT possible and in such a case the test is not valid. An additional test must be performed to establish the diagnosis.

10.1. Qualitative Interpretation

1. Remove the clamp from the Neptune Instrument and unload the strips from the clamp.
2. Place the strips with reactive face up onto the marked fields of the Diver Interpretation Template provided with the kit. This will indicate the respective positions of the different controls and antigens on the membrane.
3. The first upper dot (Positive Control) must be positive for all patients.
   Only a clearly coloured Positive Control Dot ensures your results are valid and operation was correct and/or kit components were not degraded. If the first upper dot is not coloured, the test has failed and cannot be interpreted further.
4. Compare the **specific antigen dots** to the **Negative Control Dot** (which always is the last bottom dot). The colour intensity of the Antigen dots is directly proportional to the titer of the specific antibody in the patient sample.
   The colour intensity of the Negative Control Dot may vary depending on the sample characteristics. If the sample is free of interfering substances the Negative Control Dot may be even close to uncoloured. In contrast, a highly coloured Negative Control Dot indicates a high rate of unspecific binding in the sample.

> ***POSITIVE RESULT*:**
> A sample is positive for a specific antibody if the colour intensity of the corresponding Antigen dot is higher than the intensity of the Negative Control Dot.
> ***NEGATIVE RESULT*:**
> A sample is negative for a specific antibody if the colour intensity of corresponding Antigen dot is lower than or equal to the intensity of the Negative Control Dot.

NB: A weak coloration of an antigen dot, when close to the colour intensity of the Negative Control Dot may be difficult to differentiate by visual inspection only. In such cases, it is recommended to use Neptune Quantification Software and scanning system (see 10.2) and refer to the corresponding instructions for more accurate interpretation.

10.2 Results semi-quantification: use of Neptune Quantification Software and Scanning system

The Neptune Scanner is a specially designed system for the reading of Diasource immunodot strips. It allows precise and easy insertion of test strips.
The Neptune Quantification Software allows a semi-quantification of results. Based on the image obtained, each result will be quantified in grayscale value and compared to the reference scale integrated in the Neptune Scanner cover.

These grayscale intensities will be transformed and displayed in arbitrary units (AU, from 0 to 100) based on the intensities of the controls (RC and CO, see point 9) present on the strip, according to the following conversion formula:

$$Result\ of\ antigen\ X\ (AU) = \frac{Grayscale\ intensity\ of\ antigen\ X - Grayscale\ intensity\ of\ CO}{Grayscale\ intensity\ of\ RC - Grayscale\ intensity\ of\ CO} * 100$$

1. Remove the clamp from the Neptune Instrument. Leave the processed strips attached to the clamp. Be careful: the strips must be completely dry before starting the scanning step!
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.
4. The software semi-quantifies the results, and the interpretation of the obtained values is as follows

Neptune Quantification Software arbitrary unit (AU)	Interpretation
< 5	Negative
5 – 10	Equivocal
>10	Positive

For detailed information about the Neptune Scanner and Neptune Quantification Software please refer to the Manual of Use of your Neptune Quantification Software

10.3 Important recommendations for the interpretation of results

1. Diasource's kits constitute a diagnostic aid. In consequence, no diagnosis can be established solely on the basis of our kits. The results should always be interpreted by taking into account the clinical examination, the patient's history and the results obtained by other methods.
   No single technique can rule out the possibility of false positive or false negative results. With this in mind, an indirect immunofluorescence test should, as far as possible, be carried out prior to the use of an immunodot kit (immunofluorescence being recognized as a reference method in autoimmunity).
2. The intensity of a result is not necessarily related to the degree of intensity of the disease, but rather to the level of antibodies detected.

3. Low titers of autoantibodies may occur in healthy patients. For this reason, low positive results (close to the CO, between 5 and 10 Neptune Quantification Software AU), although valid, should be considered equivocal. In such cases, the retesting of the patient, preferably by using a new sample, is recommended. If the result remains equivocal on retesting, other diagnostic tests and/or clinical information should be used to help determine the autoimmune status of the patient.
4. For various reasons, and under certain conditions, the kit may show a defect in performance (see 10.4 *Troubleshooting*). In such cases, the results are not valid and cannot be interpreted. It is recommended to repeat the test. If the error persists, please contact your distributor.
5. The intensity of the results may decrease when the device is used at the end of its life. However, the performance of the kit is not affected (detection of positives and negatives) under normal conditions of use and storage.
6. Sequential sampling (at different dates) of an autoimmune patient can sometimes lead to different results from one sample to another. This difference can have several reasons: the patient's treatment, the evolution of the disease, or a seroconversion. In the specific case of seroconversion, the result can be positive for an autoantibody in an early sampling of the patient, and become positive for another autoantibody in a later sampling of the same patient.

10.4 Troubleshooting

Problem	Possible causes + Action
Discrepancy of results as compared to a reference method	- Use - incorrect pipetting of serum - incorrect volume dispensed - Use of two different samples of the same patient (see point 10.3.6) or wrong sample handling/storage between tests - erroneous visual interpretation - erroneous Neptune Quantification Software reading ➔ repeat the test - Material - Interfering substance in the sample - Sample is a pool of different human sera ➔ repeat the test and confirm by other methods - Method - intrinsic performance of the kit (see 11.2 *Analytical sensitivity and specificity*) - expired kit - stability problem **Please contact your distributor for any further technical support requests.**
Different results in the same batch or between several batches	- Use - incorrect pipetting of serum - incorrect volume dispensed - erroneous visual interpretation or - bad Neptune Quantification Software reading ➔ repeat the test - Method - intrinsic performance of the kit (see 11.1 *Repeatability and Reproducibility*)
Contamination between neighbouring strips	- Use - incorrect pipetting of serum ➔ repeat the test - incorrect verticality of the strips on the Neptune Instrument - correct the verticality **Please contact your distributor for any further technical support requests.**
RC absent or weak	- Use - Serum not pipetted at all ➔ repeat the test - Patient with immunoglobulin deficiency ➔ repeat the test to confirm patient status - Damaged reagents ➔ check the integrity of the reagents ➔ contact your supplier if you suspect a problem - Spot not on the strip ➔ count the number of dots on the strip; if not correct, contact your supplier
CO absent	- damaged reagents ➔ check the integrity of the reagents, contact your dealer if you suspect a problem - Spot absent from the strip ➔ count the number of spots present on the strip, contact your distributor in case of incorrect number
Non-specific bindings / high background / high CO value	Suspected presence of a contaminant or an interfering substance in the patient sample ➔ repeat the test and confirm through another method **Please contact your distributor for any further technical support requests.**
Barcode of the strips or cartridges cannot be read	Manufacturing problem, please contact your distributor
Kit content incorrect	Manufacturing problem, please contact your distributor
Positive results for all the biomarkers of the kit	Problem with reagents, please contact your distributor

NOTE:

The major residual risks of the kit, as given in the risk analysis of the kit at the end of design (after mitigation), are the following:

1) Risk of false results based on a pipetting error (bad serum)
2) Risk of false results based on an interfering substance contained in the sample

11. PERFORMANCES

11.1 Repeatability and Reproducibility

Reference samples were tested for each antibody in successive statistically representative series, both in the same test as in different tests and between different batches in order to calculate the intra-assay, inter-assay and inter-lot variations respectively. In all the cases, the variations in colour intensity, when semi-quantified on the Neptune Quantification Software, were within the following expected limits:
CV ≤ 10% for intra-assay runs
CV ≤ 15% for inter-assay runs
CV ≤ 20% for inter-lot runs

11.2 Analytical sensitivity

Measurement range (semi-quantified results): From 0 AU (negative) to 100 AU (high positive).
Limit of detection: the lowest measured value of the test is 5 AU (considered as equivocal following the interpretation algorithm, see point 10.2)
As not any international standard is available for the autoantibodies, trueness of measurement and linearity are not applicable on this product.

11.3 Analytical specificity

1. The main known interfering substances were tested on each biomarker of the present kit.
   For each concentration of interfering substance tested, the difference between the result of the sample without the interfering substance and the result obtained in the presence of the interfering substance did not exceed 15%.

Interfering substance	Maximum Concentration	Intermediate Concentration	Minimum Concentration	Difference <15%
Bilirubin	100 mg/dL	50 mg/dL	25 mg/dL	Yes
Haemoglobin	200 mg/dL	100 mg/dL	50 mg/dL	Yes
Cholesterol	224.3 mg/dL	112 mg/dL	56 mg/dL	Yes
Rheumatoid factor IgM	~500IU/ml	~300IU/ml	~100IU/ml	Yes

Note: It is impossible to test all the possible interfering substances described in the literature. Other interferences, amongst others drug-induced interferences, are possible.

2. The high analytical specificity of the test is guaranteed by the quality of the antigen used. This kit detects IgG antibodies against M2/nPDC, LKM1, LC1, SLA and F-actin. No cross reactions with other autoantibodies have been found.

11.4 Clinical sensitivity and specificity

Sensitivity and Specificity were calculated from combined results obtained on clinically defined positive and negative EQAS controls and from historical data (external clinical evaluation on clinically defined positive and negative patients). These characterized samples (confirmed positive or negative for specific antibodies by reference laboratories and/or methodologies) were assayed following the test instructions. A detailed clinical report is available upon request.

SENSITIVITY:
The percentage is established with the following calculation:

$$Sensitivity = \frac{True\ Positive\ Results}{True\ Positive\ Results + False\ Negative\ Results}$$

Antigen	True Positive Results	False Negative Results	Sensitivity (%)
M2/nPDC	42	0	>99
LKM1	12	0	>99
LC1	3	0	>99
SLA	3	0	>99
F-actin	12	1	92

SPECIFICITY:
The percentage is established with the following calculation:

$$Specificity = \frac{True\ Negative\ Results}{True\ Negative\ Results + False\ Positive\ Results}$$

Antigen	True negative results	False positive results	Specificity (%)
M2/nPDC	109	0	>99
LKM1	119	0	>99
LC1	29	0	>99
SLA	30	0	>99
F-actin	137	0	>99

Note: Sensitivity and specificity values of 100 % are strictly related to sample cohorts used in clinical evaluations. In theory, a diagnostic kit shouldn't be 100% sensitive or specific (at least > 99%).

11.5 Autoantibodies diagnostic values

Anti-M2/nPDC	Anti-M2/nPDC are marker antibodies of primary biliary cholangitis (PBC) and are detectable in nearly 95% of cases. They count towards the three diagnostic criteria for PBC. Although they are highly specific for PBC, Anti-M2/nPDC can also be detected in patients with chronic inflammatory rheumatic diseases. It is believed that these patients are at an increased risk of developing PBC in addition to the underlying disease. Particularly in Anti-M2/nPDC positive CREST variant of systemic sclerosis there is an increased risk of PBC development (Fregeau et al., 1988; Zurgil et al., 1992). In patients with SLE, the presence of Anti-M2/nPDC is significantly associated with increased aminotransferase (Li et al., 2 006). Anti-M2/nPDC are detectable in 3–6% of autoimmune hepatitis (AIH) type 1 patients. These are most often cases of an AIH/PBC overlap syndrome. AIH/PBC overlap should be considered when the ALP to aminotransferase ratio is less than 1.5, IgG is elevated and the SMA are present with a titer greater than 1:80 (Bowlus & Gershwin, 2014). Anti-M2/nPDC can be predictive. They can appear years before manifestations of PBC. Individuals with persistently high Anti-M2/nPDC antibody levels have a higher risk of developing PBC. Prospective studies have shown that 76% of asymptomatic Anti-M2/nPDC positive patients over a period of observation from 11–24 years are diagnosed with PBC (Metcalf et al., 1996). The prevalence of Anti-M2/nPDC in the first-degree relatives of PBC patients is high (13.1%) (Nakamura et al., 2014). Anti-M2/nPDC titers do not change over time and are not associated with disease severity or progression (Benson et al., 2004). On the other hand some groups have been shown that the Anti-M2/nPDC titer decrease with the treatment with UDCA (Nakamura et al., 2014). Anti-M2/nPDC persist following liver transplantation.
Anti-LKM1	LKM1 antibodies are marker antibodies of *autoimmune hepatitis (AIH) type 2* and are included in the diagnostic AIH criteria of the International Autoimmune Hepatitis Group with a sensitivity of 90-95% in (mainly) young patients. They also are part of the simplified criteria of AIH. Patients with *AIH type 2* are typically ANA and SMA negative. In *primary biliary cholangitis (PBC)* and *primary sclerosing cholangitis (PSC),* LKM1 antibodies are rarely detected. LKM1 antibodies occur in ~50–60% of cases together with LC1 antibodies, however they can also be detected in isolation.

Anti-LC1	LC1 antibodies are detectable in 30–59% of patients with *autoimmune hepatitis (AIH) type 2* and are a diagnostic criterion of the International Autoimmune Hepatitis Group. They are predominantly found in children and younger patients and are often associated with LKM1 antibodies. In 50–60% of LKM1 antibody positive patients, LC1 antibodies are also detected as a second marker antibody of *AIH type 2*. In ~10% of AIH type 2 patients however, LC1 antibodies are the only marker antibodies found. In *pediatric AIH type 2*, LC1 antibodies are more frequent (59%) than in adults (28.6%).
Anti-SLA	SLA/LP antibodies are highly specific for *autoimmune hepatitis (AIH) type 3*. Although the definition of *AIH type 3* is controversial, as it is clinically and therapeutically not different from *AIH type 1*, it is clearly a separate entity due to the SLA/LP antibodies. The diagnostic sensitivity has been reported as 19–33%. Their positive predictive value is nearly 100%.
Anti-F-actin	High titers of anti-F-actin are marker antibodies and are accordingly diagnostic criteria of the International Autoimmune Hepatitis Group (three points in the scoring system for a titer >1: 80, two points for 1:80 and one point for 1:40) for *autoimmune hepatitis (AIH) type 1.* They are also part of the simplified criteria of AIH. They are very often associated with anti-nuclear antibodies (ANA), however they can be isolated positive in ~35% of *AIH type 1* patients. The diagnostic sensitivity and specificity for AIH type 1 are ~80% and 96%, respectively. Therefore, a negative anti-F-actin result cannot completely rule out AIH. The titer has a limited correlation with disease activity. Only high titers >1:80 are associated with the disease activity. Neither the antibody titer at diagnosis nor the antibody behavior in the course of the disease are prognostic markers. Note: In children a titer of 1:20 can be diagnostically relevant. Most low titers of anti-F-actin can be found in viral infections, such as *infectious mononucleosis, chronic hepatitis C* (8–10%), however also in *rheumatic diseases, primary biliary cholangitis (PBC)* (22%), patients with *alcoholic liver disease (*3-16%) and *neoplastic disease*. Their prevalence in healthy individuals is ~5%.

Publication references :

1: Chen BH, Wang QQ, Zhang W, Zhao LY, Wang GQ. Screening of anti-mitochondrial antibody subtype M2 in residents at least 18 years of age in an urban district of Shanghai, China. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016 May;20(10):2052-60. PMID: 27249604.

2: Pang SY, Dai YM, Zhang RZ, Chen YH, Peng XF, Fu J, Chen ZR, Liu YF, Yang LY, Wen Z, Yu JK, Liu HY. Autoimmune liver disease-related autoantibodies in patients with biliary atresia. World J Gastroenterol. 2018 Jan 21;24(3):387-396. doi: 10.3748/wjg.v24.i3.387. PMID: 29391761; PMCID: PMC5776400.

3: Zandanell S, Strasser M, Feldman A, Tevini J, Strebinger G, Niederseer D, Pohla-Gubo G, Huber-Schönauer U, Ruhaltinger S, Paulweber B, Datz C, Felder TK, Aigner E. Low rate of new-onset primary biliary cholangitis in a cohort of anti-mitochondrial antibody-positive subjects over six years of follow-up. J Intern Med. 2020 Apr;287(4):395-404. doi: 10.1111/joim.13005. Epub 2019 Dec 4. PMID:31802567; PMCID: PMC7154539.

4: Calise SJ, Zheng B, Hasegawa T, Satoh M, Isailovic N, Ceribelli A, Andrade LEC, Boylan K, Cavazzana I, Fritzler MJ, de la Torre IG, Hiepe F, Kohl K, Selmi C, Shoenfeld Y, Tincani A, Chan EKL; IUIS Autoantibody Standardization Committee. Reference standards for the detection of anti-mitochondrial and anti-rods/rings autoantibodies. Clin Chem Lab Med. 2018 Sep 25;56(10):1789-1798. doi: 10.1515/cclm-2017-1152. PMID: 29478040; PMCID: PMC8128709.

5: Amin K, Rasool AH, Hattem A, Al-Karboly TA, Taher TE, Bystrom J. Autoantibody profiles in autoimmune hepatitis and chronic hepatitis C identifies similarities in patients with severe disease. World J Gastroenterol. 2017 Feb 28;23(8):1345-1352. doi: 10.3748/wjg.v23.i8.1345. PMID: 28293081; PMCID: PMC5330819.

6: Deng CW, Wang L, Fei YY, Hu CJ, Yang YJ, Peng LY, Zeng XF, Zhang FC, Li YZ. Exploring pathogenesis of primary biliary cholangitis by proteomics: A pilot study. World J Gastroenterol. 2017 Dec 28;23(48):8489-8499. doi: 10.3748/wjg.v23.i48.8489. PMID: 29358857; PMCID: PMC5752709.

7: Yannick Chantrana , Christophe Corpechotb, David Haddouk, et al., Groupe d'étude de l'auto-immunité (GEAI), 8eme Colloque, Anticorps anti-gp210 et anticorps anti-Sp100 dans la cirrhose biliaire primitive: une association de très mauvais pronostic, n°464 bis, juillet/août 2014

8: Karsten Conrad, Werner Schössler, Falk Hiepe, Marvin J. Fritzler, Book "Autoantibodies in organ Autoimmune Diseases", Volume 8, second edition – 2017

9: Vanderlocht J, van der Cruys M, Stals F, Bakker-Jonges L, Damoiseaux J. Multiplex autoantibody detection for autoimmune liver diseases and autoimmune gastritis. J Immunol Methods. 2017 Sep;448:21-25. doi: 10.1016/j.jim.2017.05.003. Epub 2017 May 16. PMID: 28522403.

12. TEST LIMITATIONS

1. The results obtained with this confirmatory test are dependent on the intrinsic performance of the kit and must be considered as an aid to the final diagnosis, taking into account the results obtained by a reference technique and the clinical data of the patient.
2. In case of hyper-lipemic samples, it is recommended to centrifuge it before the pipetting of the 10µl of sample, which must be done into the supernatant.
3. The diagnosis of Auto-immune hepatitis (AIH) is based on the presence of hypergammaglobulinemia, cytolysis, cholestasis, autoantibodies characteristic of AIH or PBC (Primary Biliary Cholangitis), and inflammatory and necrotic histological lesions.
4. The concentration of autoantibodies in a serum sample is not relative to the results provided by the device.
5. There is no link between the concentration of the different autoantibodies detected by the device, and the severity of its associated auto-immune diseases.

DiaSource
DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2
BE-1348 Louvain-la-Neuve - BELGIUM
D-tek
D-tek s.a., Parc Initialis
Rue René Descartes 19
BE-7000 Mons – BELGIUM

DIASpot Neptune Liver^5 IgG

Código para pedidos: KAPDTLI5N

Protocolo Neptune: 02

1. USO PREVISTO

DIASpot Neptune Liver5 IgG es un kit de inmunotransferencia por puntos para la detección, exclusivamente en suero humano, de autoanticuerpos IgG contra los antígenos M2/nPDC, LKM1, LC1, SLA y actina F.

Este kit está concebido para confirmar los resultados de los patrones obtenidos por inmunofluorescencia, el método de cribado y de referencia en las pruebas de autoinmunidad; el kit está destinado a servir de ayuda en el diagnóstico de varias enfermedades autoinmunitarias (para más detalles véase el apartado 11.5 «Valores diagnósticos de los autoanticuerpos»).

Esta prueba está pensada para utilizarse de forma rutinaria en una población grande.
El kit está estrictamente reservado para uso profesional en laboratorios de análisis clínicos. El kit está estrictamente diseñado como una prueba automática y solo puede utilizarse con un Neptune Instrument.
La detección de los diferentes autoanticuerpos IgG puede ser cualitativa (véase el apartado 10.1) o semicuantitativa (véase el apartado 10.2).
Para una semicuantificación de los resultados de la prueba, debe utilizarse el sistema de Neptune Scanner y el Neptune Quantification Software. Dicho sistema no está incluido en el Neptune Instrument.

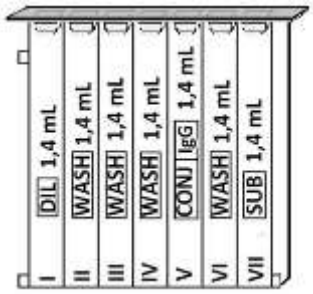
2. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Este kit y todos sus componentes están destinados a procesarse únicamente en el Neptune Instrument.
La prueba se basa en el principio del inmunoanálisis enzimático (EIA). Las tiras constan de una membrana unida a un soporte específico de plástico. Durante el procedimiento de análisis automático, el Neptune Instrument incuba secuencialmente las tiras en los pocillos de los cartuchos de reactivos listos para usar. De forma resumida, primero se incuban las tiras con los sueros diluidos de los pacientes. Los anticuerpos humanos, si están presentes, se unen al antígeno o a los antígenos específicos correspondientes de la membrana. Los anticuerpos no unidos o sobrantes se eliminan mediante lavado. Tras una nueva incubación con anticuerpos de cabra contra la IgG humana conjugados con AP, el conjugado enzimático se une a los complejos antígeno-anticuerpo. Después de eliminar el exceso de conjugado mediante lavado, las tiras se incuban finalmente en una solución de sustrato. La actividad enzimática, si se produce, provoca la aparición de puntos de color morado en las almohadillas de la membrana. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presente en la muestra.
El kit contiene 24 pruebas de un solo uso.

3. CONTENIDO DEL KIT

Antes de utilizar el kit, compruebe que contiene todos los elementos indicados a continuación. Verifique también que las características del producto se correspondan con las descritas más abajo.
Si falta alguno o si hay algún elemento dañado, no utilice el kit y póngase en contacto con su distribuidor.

3.1 COMPONENTES

		TIRA	CARTUCHO
Tiras	3 x 8 unidades sobre soportes de plástico separables individualmente; en una bolsa de aluminio sellada. Cada tira es de un solo uso. <u>7 puntos en cada una</u>: 1 control positivo (RC) 5 antígenos 1 control negativo (CO)		 **Documentos:** Instrucciones de uso (IFU) Certificado de análisis (CoA)
Cartucho	24 unidades, con 7 compartimentos cada una; selladas. Cada cartucho es de un solo uso.		
Tampón de dilución	Posición I, 1 x 1,4 ml (amarillo) *Contenido:* *H_2O • TBS • NaCl • Tween • BSA • Conservantes • Colorante • Emulsión antiespumante*		
Tampón de lavado	Posiciones II, III, IV y VI, 4 x 1,4 ml (incoloro) *Contenido:* *H_2O • TBS • NaCl • Tween • Conservantes • Emulsión antiespumante*		
Conjugado	Posición V, 1 x 1,4 ml (rojo) *Contenido:* *H_2O • TBS • NaCl • KCl • $MgCL_2$ • Anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con AP • Conservantes • Colorante • Emulsión antiespumante*		
Sustrato	Posición VII, 1 x 1,4 ml (solución de color amarillo pálido) *Contenido:* *H_2O • Conservantes • $MgCL_2$ • TBS • Estabilizante de NBT • NBT • BCIP*		

Abreviaturas por orden alfabético:
AP = fosfatasa alcalina; BCIP = bromo-cloro-indolilfosfato; BSA = albúmina de suero bovino; KCl = cloruro de potasio; $MgCl_2$ = cloruro de magnesio; NaCl = cloruro de sodio; NBT = azul de nitrotetrazolio; TBS = solución salina tamponada con Tris

Para obtener más información sobre la composición y la concentración de los principios activos utilizados, consulte las correspondientes HDSM, disponibles a petición o en www.diasource-diagnostics.com.

Símbolos utilizados en las etiquetas del kit

	Consultar las instrucciones de uso	CE 2797	Marca CE + Organismo notificado
IVD	Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*	Σ 24	Para 24 usos
2°C 8°C	Conservar a 2-8 °C	REF	Referencia
LOT	Número de lote		Proteger de la luz solar directa
	Fecha de caducidad		Fabricante
CART	Cartucho		No reutilizar
STRIP	Tira		Precaución

3.2 Antígenos utilizados

M2/nPDC	Subunidades E1, E2 y E3 del complejo piruvato-deshidrogenasa (purificado a partir de corazón bovino)
LKM1	Citocromo P450 2D6-oxidasa (antígeno microsoma hepatorrenal tipo I), de longitud completa (recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus)
LC1	Formiminotransferasa-ciclodeaminasa (antígeno citosol hepático tipo I) (recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus)
SLA	Antígeno soluble hepático (recombinante, humano, expresado en células bacterianas de E. coli)
Actina F	Filamentos de actina polimerizados *in vitro* (preparado a partir de actina G purificada de músculo esquelético de conejo)

3.3 Componentes reactivos

Sustancia	**Origen**	**Uso previsto en los kits LIVER**	**Concentración en los kits LIVER**	**Pureza**
Anticuerpo anti-IgG humana de cabra con fosfatasa alcalina	Animal (cabra)	Anticuerpo secundario (anticuerpo de detección) en tampón de conjugado	< 0,1 µg/ml en tampón de conjugado	Desconocido. Ningún anticuerpo es detectable por componentes del suero que no sean inmunoglobulinas.
Antígeno M2/nPDC	Purificado a partir de corazón bovino	Biomarcador (antígeno) como recubrimiento de las tiras	< 0,5 mg/ml Un punto de M2/nPDC = 0,5 µl en cada tira	> 80 %
Antígeno LKM1	Recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus	Biomarcador (antígeno) como recubrimiento de las tiras	< 0,5 mg/ml Un punto de LKM1 = 0,5 µl en cada tira	> 80 %
Antígeno LC1	Recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus	Biomarcador (antígeno) como recubrimiento de las tiras	< 0,5 mg/ml Un punto de LC1 = 0,5 µl en cada tira	> 80 %
Antígeno SLA	Recombinante, humano, expresado en células bacterianas de E. coli	Biomarcador (antígeno) como recubrimiento de las tiras	< 0,5 mg/ml Un punto de SLA = 0,5 µl en cada tira	> 80 %
Antígeno actina F	Preparado a partir de actina G purificada de músculo esquelético de conejo	Biomarcador (antígeno) como recubrimiento de las tiras	< 0,5 mg/ml Un punto de actina F = 0,5 µl en cada tira	> 80 %
Proteína L	Bacteriano (de *Peptostreptococcus magnus*)	Control reactivo (positivo)	0,01 mg/ml Un punto de RC = 0,5 µl en cada tira	> 95 %
Estreptavidina con fosfatasa alcalina	Bacteriano (de *Streptomyces avidinii*)	Control del valor de corte (negativo)	< 0,1 µg/ml Un punto de CO = 0,5 µl en cada tira	Desconocido.
NBT-BCIP	Sintético (sustancia química)	Sustrato para la fosfatasa alcalina	0,2 mg/ml	≥ 98 %

4. MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

Neptune Instrument:

El Neptune Instrument es un equipo que realiza los distintos pasos de incubación y lavado de las tiras de inmunotransferencia por puntos de Diasource, desde el depósito de la muestra hasta el desarrollo de color final. La capacidad máxima es de 24 tiras que se incuban de forma simultánea. Cada tira está asociada a un cartucho que contiene los distintos reactivos necesarios para el análisis. El Neptune Instrument cuenta con un lector de código de barras que controla la asociación correcta entre una tira y su cartucho.
Se recomienda encarecidamente impartir formación al personal antes de utilizar este kit (póngase en contacto con su distribuidor).
Consulte el manual del usuario antes de utilizar el Neptune Instrument.

El Neptune Scanner y el Neptune Quantification Software:

El Neptune Scanner y el Neptune Quantification Software se han diseñado para leer los resultados del análisis de las tiras de inmunotransferencia por puntos de Diasource. El software y el escáner deben utilizarse de forma combinada.
El escáner se ha desarrollado específicamente para leer las tiras con este diseño especial. Basándose en la imagen de las tiras escaneadas, el software convierte la intensidad de cada punto/línea en un valor numérico (la escala numérica se basa en la intensidad de una escala de grises). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (de 0 a 100). Se pueden leer de 1 a 24 tiras.
Se recomienda encarecidamente impartir formación al personal antes de utilizar este kit (póngase en contacto con su distribuidor).
Póngase en contacto con su distribuidor para obtener la última versión del software.
Consulte el manual del usuario antes de utilizar el escáner y el software.

Otro material: Micropipetas, papel absorbente, equipo de protección (véase el apartado 6).

5. CONSERVACIÓN

El kit de la prueba debe conservarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante todo su periodo de validez (consulte la fecha de caducidad indicada en el kit). No congelar.
Después de la apertura inicial del kit, los cartuchos de reactivos sin usar deben conservarse a 2-8 °C protegidos de la luz (solar) y, preferiblemente, en la caja original del kit.
Las tiras no utilizadas deben volver a colocarse en las bolsas suministradas, sellarse y conservarse a 2-8 °C, preferiblemente en la caja original del kit. Si se conservan correctamente, todos los componentes del kit de la prueba permanecerán estables hasta la fecha de caducidad indicada.

6. MEDIDAS DE SEGURIDAD

1. Todos los reactivos son exclusivamente para diagnóstico *in vitro* y uso profesional. El kit de la prueba debe procesarlo exclusivamente personal técnico con la debida formación.
2. Los reactivos del kit se consideran no peligrosos, ya que las concentraciones de sustancias químicas potencialmente peligrosas son inferiores a los umbrales establecidos en la normativa europea:

Nombre	**CAS**	**EINECS**	**Concentración en la tira**	**Clasificación conforme al Reglamento (CE) n.º 1272/2008 Significado Frases H**
Nitrocelulosa	9004-70-0	-	< 5 %	Sólido inflamable 1 H228

Anexo VI del Reglamento (CE) n.º 1272/2008: n.º de índice: 603-037-00-6; Reglamento (UE) 2015/830 de la Comisión, punto 3.2.1.

Nombre	**CAS**	**EINECS**	**Concentración en la mezcla**	**Clasificación (en forma concentrada) conforme al Reglamento (CE) n.º 1272/2008 Significado Frases H**
MIT:	55965-84-9	-	< 0,0015 %	Toxicidad aguda 2, H330 Toxicidad aguda 2, H310 Toxicidad aguda 3, H301 Corrosión cutánea 1C, H314; C ≥ 0,6 % Lesiones oculares 1, H318; C ≥ 0,6 % Sensibilización cutánea 1A, H317; C ≥ 0,0015 % Peligro acuático agudo 1, H400 Peligro acuático crónico 1, H410

Anexo al Reglamento (UE) 2018/1480 de la Comisión; n.º de índice: 613-167-00-5; Reglamento (UE) 2015/830 de la Comisión, punto 3.2.1.

Nombre	**CAS**	**EINECS**	**Concentración en la mezcla**	**Clasificación (en forma concentrada) conforme al Reglamento (CE) n.º 1272/2008 Significado Frases H**
NaN_3	26628-22-8	247-852-1	<0,1 %	Toxicidad aguda 2 H300 Toxicidad aguda 1 H310 STOT RE 2 H373 Peligro acuático agudo 1 H400 Peligro acuático crónico 1 H410

Anexo VI del Reglamento (CE) n.º 1272/2008: n.º de índice: 011-004-00-7; Reglamento (UE) 2015/830 de la Comisión, punto 3.2.1.

Nombre	CAS	EINECS	Concentración en la mezcla	Clasificación (en forma concentrada) conforme al Reglamento (CE) n.º 1272/2008 Significado Frases H
NBT	298-83-9	206-067-4	< 0,01 %	Toxicidad aguda 4 H302

Sin embargo, estas sustancias químicas son tóxicas en forma concentrada. Por tanto, debe evitarse el contacto con la piel, los ojos y las mucosas utilizando elementos adecuados de protección personal (guantes, bata de laboratorio, gafas de seguridad). Al igual que sucede con cualquier sustancia química con peligros específicos, el producto y sus componentes deben ser manipulados exclusivamente por personal cualificado y con las debidas precauciones.

3. Las muestras de los pacientes deben manipularse como sustancias potencialmente infecciosas; por tanto, se debe utilizar una protección adecuada (guantes, bata de laboratorio, gafas de seguridad). En cualquier caso, deben aplicarse las BPL con todas las normas de seguridad generales e individuales que sean de rigor.
4. Eliminación de residuos: Las muestras de los pacientes, las tiras reactivas incubadas y los cartuchos usados deben manipularse como residuos infecciosos. No es necesaria la eliminación selectiva de las cajas y los demás recipientes, a menos que se indique de otro modo en la normativa vigente.
5. Este kit contiene sustancias de origen animal, humano y bacteriano (véase el apartado 3.3) en muy baja concentración. Todas estas sustancias se han seleccionado de modo que no contengan ningún agente microbiano o transmisible y no son tóxicas en la concentración utilizada en el kit. No obstante, es necesario aplicar buenas prácticas de laboratorio (uso de gafas y guantes) en el lugar donde se utilicen.

7. RECOMENDACIONES

1. Diasource y sus distribuidores autorizados declinan toda responsabilidad por los daños causados indirectamente o provocados por un cambio o modificación del procedimiento indicado, un uso inadecuado del kit y/o el uso de un kit incompleto o dañado. El uso de este kit está reservado exclusivamente a personal técnico cualificado.
2. La responsabilidad de Diasource quedará limitará en cualquier caso a la sustitución del kit.
3. En caso de que se produzca un incidente grave (una lesión, un problema de salud o la muerte) con este producto para diagnóstico *in vitro*, notifíquelo inmediatamente al fabricante (en la dirección que figura más abajo) y a las autoridades sanitarias de su país.

8. RECOGIDA, MANIPULACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los sueros con partículas deben centrifugarse a baja velocidad. Para la toma de muestras de sangre, deben utilizarse tubos secos. No utilice mezclas de distintos sueros, ya que los resultados pueden ser contradictorios (véase el apartado 10.4). Después de la separación, las muestras de suero deben utilizarse inmediatamente o dividirse en alícuotas y conservarse a una temperatura de 2-8 °C (para un periodo máximo de 14 días) o congelarse a –20 °C (para periodos de conservación más largos, con un máximo de 13 meses). Las muestras pueden someterse como máximo a 10 ciclos repetidos de congelación y descongelación.

9. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

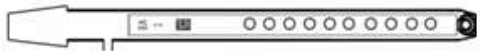
INFORMACIÓN BÁSICA, MANIPULACIÓN Y CONSEJOS:

Principio del PROCESO DE LA PRUEBA:

Después de la carga manual de las tiras y los cartuchos de reactivos, el *Neptune Instrument* procesa automáticamente los pasos de incubación y lavado; mediante la continua agitación hacia arriba y hacia abajo de las tiras en los pocillos de los cartuchos de reactivos listos para usar, se asegura una circulación eficaz de los líquidos sobre las tiras. Todo el procedimiento de la prueba se realiza a temperatura ambiente.

Descripción de las TIRAS:

La ***cara reactiva (anterior)*** de las tiras está recubierta con antígenos que presentan el aspecto de puntos de color azul tenue. Este color asegura que todos los antígenos están correctamente colocados en la membrana. El color desaparece durante el procesamiento de la prueba. La cara anterior también contiene un número de tira y un código de barras cuadrado bidimensional para la trazabilidad de las tiras después de retirarlas del Neptune Instrument al final de la prueba.



La ***cara no reactiva (posterior)*** de las tiras contiene información alfanumérica y en código de barras con la que el Neptune Instrument identifica el tipo y el número de lote de las tiras.

Las tiras deben introducirse manualmente en la pinza antes de iniciar el proceso automático (consulte los apartados 9.1 y 9.2, «*Preparación de la prueba*»). Durante esta operación, evite tocar con los dedos la zona de la membrana de las tiras. Utilice siempre guantes de laboratorio y sostenga y manipule las tiras por las zonas de plástico (el soporte de la tira).

Descripción de los CARTUCHOS: **(véase la imagen de la página 1)**

Los cartuchos de reactivos constan de 7 pocillos diferentes llenos de reactivos listos para usar. Los cartuchos están sellados y los pocillos de reactivo están separados herméticamente. Antes de iniciar la prueba, los cartuchos deben desprecintarse. Una vez abiertos, los cartuchos deben manipularse con cuidado para evitar derrames de reactivos y contaminación entre pocillos.

La cara posterior de los cartuchos está etiquetada con información alfanumérica y en código de barras con la que el Neptune Instrument identifica el tipo y el número de lote del cartucho.

Los cartuchos deben cargarse manualmente en el soporte de cartuchos antes de iniciar el proceso automático (consulte los apartados 9.1 y 9.2 *Preparación de la prueba*). Las caras anterior y posterior de los cartuchos tienen, respectivamente, un borde de plástico triangular en la parte inferior y dos bordes de plástico cuadrados (uno abajo y otro arriba) para colocarlos en el soporte en la posición y orientación adecuadas.

Descripción de los CONTROLES:

El **control positivo** o **RC (control de reacción)** consiste en una proteína (proteína L) que fija todas las inmunoglobulinas presentes en la muestra analizada. Si la prueba se ha realizado correctamente, este control presentará una coloración al final de la prueba (con una intensidad que dependerá de la concentración efectiva de inmunoglobulinas de la muestra).

La ausencia de coloración de este punto al final de la prueba puede indicar que la muestra no se ha pipeteado en la tira (véase el apartado 10.4, «*Solución de problemas*»).

El **control negativo o CO (control de corte)** consiste en una proteína (estreptavidina con fosfatasa alcalina) que reacciona con el sustrato enzimático y con determinados elementos constituyentes de la muestra analizada. Si la prueba se ha realizado correctamente, este control presentará una coloración al final de la prueba, que dependerá de la cinética del sustrato y de las

características de la muestra. La intensidad de este control sirve como valor umbral para la interpretación final de los resultados (véase el apartado 10, «*Interpretación de los resultados*»).

Asociación entre TIRAS y CARTUCHOS

Las tiras y los cartuchos de un mismo kit de análisis tienen el mismo número de lote y están destinados a asociarse por pares específicos de cada lote. No asocie una tira y un cartucho con números de lote diferentes, ya que el Neptune Instrument consideraría que esta asociación es una configuración no válida y detendría el proceso.
Siempre que cada par de tira/cartucho sea válido, el Neptune Instrument puede procesar asociaciones de tiras/cartuchos de diferentes kits; sin embargo, solo los kits que tienen el mismo número de protocolo (el mismo tiempo y secuencia de incubación) pueden procesarse juntos en un mismo análisis (consulte el número de protocolo indicado bajo la referencia del kit, en la parte superior de la primera página).

9.1 Preparación de la prueba en el Neptune Instrument

Antes de utilizar el Neptune Instrument por primera vez, consulte el manual de usuario suministrado con el instrumento.

- Deje que todos los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente (de +18 °C a +25 °C) antes de utilizarlos.
- Debe elaborarse siempre una lista de trabajo (ya sea en el Neptune Quantification Software o de otro modo) para facilitar la carga y la correcta asociación entre las tiras, los cartuchos y las muestras de los pacientes.
- Compruebe que el soporte de cartuchos esté bien sujeto en su sitio en el Neptune Instrument.
- Asegúrese de que el Neptune Instrument esté conectado a una toma de corriente.

La siguiente secuencia de pasos resume las operaciones de carga y preparación del Neptune Instrument, de las tiras reactivas, de los cartuchos de reactivos y de las muestras de los pacientes que deben realizarse antes de iniciar el análisis. Para obtener información detallada o en caso de que surja algún problema en uno de los pasos siguientes, consulte el manual del usuario del Neptune Instrument.

1. Encienda el Neptune Instrument y espere unos segundos hasta que la pantalla táctil muestre la fecha y la hora.
2. Confirme que la fecha y la hora son correctas pulsando **V** en la pantalla táctil (en el primer uso o para reiniciar el instrumento, consulte el manual del usuario del Neptune Instrument) → la pantalla mostrará «***Initialize?***».
3. Confirme el reinicio pulsando **V** en la pantalla táctil → el brazo horizontal del instrumento avanzará automáticamente hasta una posición central (en espera) → la pantalla mostrará ***«Load strips (24)»***.
4. (No establezca ni confirme el número de tiras en este paso). Retire la pinza de su sitio en el brazo tirando de ella hacia arriba con cuidado y cargue entonces las tiras que va a analizar: sostenga la pinza con la cara numerada hacia arriba (posición abierta) e inserte las tiras, también con la cara numerada (reactiva) hacia arriba, introduciendo la parte de plástico superior (la lengüeta) en los correspondientes orificios de la pinza. Presione suavemente para asegurarse de que la lengüeta de plástico llegue al extremo inferior del orificio.
   Notas:
   Comience siempre a cargar por la posición 1 de la pinza (lado izquierdo) y no deje nunca espacios vacíos entre las tiras.
   Una vez cargadas las tiras, compruebe visualmente su alineación vertical, horizontal y lateral. Cualquier desalineación evidente debe corregirse descargando la tira o las tiras de la pinza y volviendo a cargarlas.
   Atención: los trozos de plástico que queden después de la rotura de cada soporte de tiras pueden dificultar el procesamiento en el instrumento y/o la lectura con el escáner Neptune Scanner; córtelos con unas tijeras.
5. Vuelva a colocar la pinza en su sitio en el brazo empujándola suavemente hacia abajo.
6. Especifique el número de tiras cargadas mediante las flechas hacia arriba y hacia abajo de la pantalla táctil.
7. Confirme el número de tiras cargadas pulsando **V** en la pantalla táctil → el brazo horizontal retrocederá automáticamente para colocarse sobre los orificios de alineación del soporte de cartuchos → la pantalla mostrará ***«Check alignment»***.
8. Utilice la función «Paso a paso» que verá en la pantalla para comprobar que las tiras están correctamente alineadas: mantenga una suave presión sobre la flecha hacia abajo en la pantalla táctil hasta que la parte inferior de las tiras se introduzca en los orificios de alineación del soporte de cartuchos. Si están alineadas correctamente, las tiras no tocarán los contornos de los orificios.
   Nota:
   Si las tiras están desalineadas (y por tanto entran en contacto con el soporte de cartuchos) consulte el manual del usuario del Neptune Instrument.
9. Confirme la correcta alineación de las tiras pulsando **V** en la pantalla táctil → el Neptune Instrument bajará las tiras por completo, introduciéndolas en los orificios de alineación, y leerá los códigos de barras de las tiras → una vez leídos todos los códigos de barras, la pantalla táctil mostrará «***Load reagent***».
   Nota:
   En caso de que falle la lectura de uno o varios códigos de barras de las tiras (parpadeará el LED de la posición no leída) consulte el manual del usuario del Neptune Instrument.
10. Abra los cartuchos de reactivos e introdúzcalos en las correspondientes muescas del soporte de cartuchos, bajo sus respectivas tiras.
11. Confirme la finalización de la carga de cartuchos pulsando **V** en la pantalla táctil → el Neptune Instrument leerá los códigos de barras de los cartuchos y comprobará su correcta asociación con las tiras → una vez leídos todos los códigos de barras, en la pantalla se indicará el número de tiras (las asociaciones validadas de tira/cartucho).
    Nota:
    En caso de que falle la lectura de uno o varios códigos de barras de los cartuchos o si se detecta una asociación errónea de tira/cartucho (parpadeará el LED de la posición correspondiente) consulte el manual del usuario del Neptune Instrument.
12. Confirme el número de tiras pulsando **V** en la pantalla táctil → la pantalla mostrará el número de protocolo identificado en los códigos de barras (***«Protocol ID xx»***).
13. Confirme el número de protocolo pulsando **V** en la pantalla táctil → la pantalla mostrará ***«Please close cover»***.
14. Cierre la cubierta del Neptune Instrument y confirme que está cerrada pulsando **V** en la pantalla táctil → el Neptune Instrument procederá a realizar un primer paso de lavado (pretratamiento) incubando las tiras en el segundo pocillo de los cartuchos (tiempo de procesamiento: 1 minuto) → al final del paso de humectación, la pantalla mostrará ***«Please open cover»***.
15. Abra la cubierta del Neptune Instrument y confirme que está abierta pulsando **V** en la pantalla táctil → el brazo horizontal avanzará automáticamente hasta la parte delantera del instrumento e inclinará las tiras → en la pantalla se mostrará «***Dry strips***».
16. Seque las tiras aplicando suavemente papel absorbente sobre la base de la pequeña cavidad inferior (el orificio de carga de muestras).
17. Confirme el secado pulsando **V** en la pantalla táctil → la pantalla mostrará ***«Apply samples»***.
18. Aplique las muestras pipeteando 10 µl de suero del paciente en los orificios inferiores de carga de muestras de las tiras.
    Nota:
    Si lo prefiere, puede pipetear los 10 µl de suero directamente en el tampón de dilución («pocillo I») del cartucho. Esta operación puede realizarse en cualquier momento desde la apertura de los cartuchos (véase el punto 9.1.10).
19. Confirme la carga de las muestras pulsando **V** en la pantalla táctil → la pantalla mostrará ***«Please close cover»***.
    Cierre la cubierta del Neptune Instrument y confirme que está cerrada pulsando **V** en la pantalla táctil → el Neptune Instrument iniciará la prueba automáticamente siguiendo la secuencia de pasos del protocolo (véase el apartado 9.3). Una vez finalizado el proceso, la pinza se moverá hasta una posición central (en espera) en el Neptune Instrument para permitir una fácil manipulación de la pinza. El instrumento emitirá un pitido y la pantalla mostrará ***«Finished test»***.

20. Aplique suavemente papel absorbente sobre la base de las tiras para eliminar el líquido de la pequeña cavidad inferior (el orificio de carga de muestras) y deje que las tiras se sequen durante 30 minutos antes de proceder a interpretar los resultados. La interpretación debe realizarse en las 24 horas siguientes al procesamiento de la prueba. En caso de utilizar el Neptune Scanner como ayuda para la interpretación de los resultados, deje las tiras procesadas unidas a la pinza.

REGISTRO DE LOS DATOS DE LA PRUEBA

El protocolo de la prueba puede descargarse pulsando el símbolo de la memoria USB y siguiendo las indicaciones de la pantalla: Insertar USB →Escribiendo USB → Sacar USB. Este paso no es obligatorio, pero se recomienda encarecidamente por motivos de trazabilidad y normativos.

9.2 Procesamiento de la prueba (protocolo 02 para todos los kits de inmunotransferencia por puntos de Diasource en el Neptune Instrument):

Paso	Descripción	Tiempo de procesamiento
01.	Las tiras se incuban en el primer pocillo del cartucho (*tampón de dilución*). Tras entrar en contacto con el líquido de los pocillos y someterlas a agitación, las muestras precargadas de los pacientes (véase el punto 9.1.18) se liberan desde la pequeña cavidad de la parte inferior de las tiras y se diluyen en el tampón.	30 min
02.	La pinza se mueve hacia delante y las tiras se incuban en el segundo pocillo del cartucho (*tampón de lavado*)	2 min
03.	La pinza se mueve hacia delante y las tiras se incuban en el tercer pocillo del cartucho (*tampón de lavado*)	2 min
04.	La pinza se mueve hacia delante y las tiras se incuban en el sexto pocillo del cartucho (*tampón de lavado*)	2 min
05.	La pinza se mueve hacia atrás y las tiras se incuban en el quinto pocillo del cartucho (*conjugado*)	10 min
06.	La pinza se mueve hacia atrás y las tiras se incuban en el cuarto pocillo del cartucho (*tampón de lavado*)	2 min
07.	La pinza se mueve hacia atrás y las tiras se incuban en el tercer pocillo del cartucho (*tampón de lavado*)	2 min
08.	La pinza se mueve hacia atrás y las tiras se incuban en el segundo pocillo del cartucho (*tampón de lavado*)	2 min
09.	La pinza se mueve hacia delante y las tiras se incuban en el séptimo pocillo del cartucho (*sustrato*)	10 min
10.	La pinza se mueve hacia atrás y las tiras se incuban en el sexto pocillo del cartucho (*tampón de lavado*)	2 min

10. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Aunque puede hacerse una interpretación visual (cualitativa) de los resultados, generalmente se recomienda utilizar el Neptune Scanner y el Neptune Quantification Software para alcanzar más precisión y realizar una interpretación semicuantitativa.

AVISO IMPORTANTE: NO es posible que todos los parámetros de este kit den un resultado positivo y en tal caso la prueba debe considerarse no válida. Para establecer el diagnóstico deberá realizarse una prueba adicional.

10.1 Interpretación cualitativa

1. Retire la pinza del Neptune Instrument y descargue las tiras de la pinza.
2. Coloque las tiras con la cara reactiva hacia arriba en los campos marcados de la plantilla de interpretación Diver que se suministra con el kit. Esto indicará las respectivas posiciones de los diferentes controles y antígenos en la membrana.
3. El primer punto superior (control positivo) debe ser positivo para todos los pacientes.
   Solo un punto de control positivo que esté claramente coloreado garantiza que los resultados son válidos y el procesamiento ha sido correcto y/o que los componentes del kit no estaban deteriorados. Si el primer punto superior no está coloreado, la prueba ha fallado y no es posible interpretar los resultados.
4. Compare los **puntos de antígeno específico** con el **punto de control negativo** (que es siempre el último punto inferior). La intensidad del color de los puntos de antígeno es directamente proporcional al valor del anticuerpo específico en la muestra del paciente.
   La intensidad del color del punto de control negativo puede variar según las características de la muestra. Si la muestra está libre de sustancias interferentes, el punto de control negativo puede ser incluso casi incoloro. En cambio, un punto de control negativo muy coloreado indica una elevada tasa de unión no específica en la muestra.

***RESULTADO POSITIVO*:**
Una muestra es positiva para un anticuerpo específico si la intensidad del color del correspondiente punto de antígeno es superior a la intensidad del punto del control negativo.

***RESULTADO NEGATIVO*:**
Una muestra es negativa para un anticuerpo específico si la intensidad del color del correspondiente punto de antígeno es igual o inferior a la intensidad del punto del control negativo.

Nota: Una coloración débil de un punto de antígeno, si es similar a la intensidad de color del punto del control negativo, puede resultar difícil de diferenciar solo mediante inspección visual. En estos casos, se recomienda utilizar el Neptune Quantification Software y el sistema de escaneo (véase el apartado 10.2) y consultar las instrucciones correspondientes para realizar una interpretación más precisa.

10.2 Semicuantificación de los resultados: uso del sistema Neptune Scanner/Neptune Quantification Software

El sistema Neptune Scanner/Neptune Quantification Software es un sistema diseñado especialmente para la lectura de tiras de inmunotransferencia por puntos de Diasource. Permite introducir las tiras reactivas de una manera fácil y precisa.
El software permite realizar una semicuantificación de los resultados. A partir de la imagen obtenida, cada resultado se cuantificará mediante un valor en escala de grises y se comparará con la escala de referencia integrada en la cubierta del Neptune Scanner.

Estas intensidades en escala de grises se transformarán y se expresarán en unidades arbitrarias (UA, de 0 a 100), en función de las intensidades de los controles de la tira (RC y CO; véase el apartado 9), aplicando la siguiente fórmula de conversión:

$$Resultado\ del\ antígeno\ X\ (UA) = \frac{Intensidad\ del\ antígeno\ X\ en\ escala\ de\ grises\ -\ Intensidad\ del\ CO\ en\ escala\ de\ grises}{Intensidad\ del\ RC\ en\ escala\ de\ grises\ -\ Intensidad\ del\ CO\ en\ escala\ de\ grises} * 100$$

1. Retire la pinza del Neptune Instrument. Deje las tiras procesadas unidas a la pinza. Tenga cuidado: las tiras deben estar siempre completamente secas antes de comenzar a escanearlas.
2. Introduzca la pinza, con la cara reactiva de las tiras hacia abajo, en su correspondiente sitio de la cubierta del Neptune Scanner.
3. Comience a escanear las tiras con el Neptune Quantification Software.
4. El software semicuantifica los resultados, y la interpretación de los valores obtenidos es la siguiente:

Unidad arbitraria (UA) del Neptune Quantification Software	Interpretación
< 5	Negativo
5-10	Dudoso
> 10	Positivo

Para obtener información detallada sobre el Neptune Scanner y el Neptune Quantification Software, consulte el manual del usuario.

10.3 Recomendaciones importantes para la interpretación de los resultados

1. Los kits de Diasource están pensados como una ayuda para el diagnóstico. Por tanto, no puede establecerse ningún diagnóstico que se base únicamente en nuestros kits. Los resultados siempre deben interpretarse teniendo en cuenta la exploración clínica, la anamnesis del paciente y los resultados obtenidos con otros métodos.
   Ninguna técnica puede por sí sola descartar la posibilidad de obtener resultados falsos positivos o falsos negativos. En consecuencia, siempre que sea posible, debe realizarse una prueba de inmunofluorescencia indirecta antes de utilizar un kit de inmunotransferencia por puntos (la inmunofluorescencia es el método de referencia en las pruebas de autoinmunidad).
2. La intensidad de un resultado no está necesariamente relacionada con el grado de intensidad de la enfermedad, sino más bien con el nivel de anticuerpos detectado.
3. Pueden obtenerse valores bajos de autoanticuerpos en pacientes sanos. Por ello, los resultados positivos bajos (cercanos al CO, entre 5 y 10 UA de Neptune Quantification Software), aunque sean válidos, deben considerarse dudosos. En tales casos, se recomienda repetir la prueba al paciente, preferiblemente con una nueva muestra. Si el resultado sigue siendo dudoso al repetir rl análisis, deben utilizarse otras pruebas diagnósticas y/o los datos clínicos como ayuda para determinar el estado autoinmunitario del paciente.
4. Por diversos motivos, y en determinadas condiciones, el kit puede presentar algún problema de funcionamiento (consulte el apartado 10.4, «*Solución de problemas*»). En estos casos, los resultados no son válidos y no pueden interpretarse. Se recomienda repetir la prueba. Si el error persiste, póngase en contacto con su distribuidor.
5. La intensidad de los resultados puede disminuir hacia el final de la vida útil del producto. Sin embargo, el rendimiento del kit (detección de positivos y negativos) no se ve afectado en condiciones normales de uso y conservación.
6. En ocasiones, el muestreo secuencial (en fechas distintas) de un paciente con una enfermedad autoinmune puede arrojar resultados distintos de una muestra a otra. Esta diferencia puede tener varias causas: el tratamiento del paciente, la evolución de la enfermedad o una seroconversión. En el caso concreto de la seroconversión, el resultado puede ser positivo para un autoanticuerpo de una muestra temprana del paciente y, después, volverse positivo para otro autoanticuerpo en una muestra posterior del mismo paciente.

10.4 Solución de problemas

Problema	**Posibles causas + medidas**
Discrepancia de los resultados con respecto a un método de referencia	- Uso - pipeteado incorrecto del suero - volumen dispensado incorrecto - uso de dos muestras distintas del mismo paciente (véase el apartado 10.3.6) o manipulación/conservación incorrecta de las muestras entre pruebas - Interpretación visual errónea - Lectura de Neptune Quantification Software errónea ➔ Repetir la prueba - Material - presencia de sustancias interferentes en la muestra - la muestra es una mezcla de distintos sueros humanos ➔ Repetir la prueba y confirmar el resultado mediante otros métodos - Método - Rendimiento intrínseco del kit (véase el apartado 11.2, «*Sensibilidad y especificidad analíticas*») - kit caducado - problema de estabilidad **Póngase en contacto con su distribuidor para cualquier otra solicitud de asistencia técnica.**
Resultados diferentes en el mismo lote o entre varios lotes	- Uso - pipeteado incorrecto del suero - volumen dispensado incorrecto - Interpretación visual errónea o ➔ Error de lectura de Neptune Quantification Software ➔ Repetir la prueba - Método - Rendimiento intrínseco del kit (véase el apartado 11.1, «*Repetibilidad y reproducibilidad*»)
Contaminación entre tiras contiguas	- Uso - pipeteado incorrecto del suero ➔ Repetir la prueba - Falta de verticalidad de las tiras en el Neptune Instrument ➔ Corregir la verticalidad **Póngase en contacto con su distribuidor para cualquier otra solicitud de asistencia técnica.**
RC ausente o débil	- Uso - No se ha pipeteado suero ➔ Repetir la prueba - Paciente con déficit de inmunoglobulinas ➔ Repetir la prueba para confirmar el estado del paciente - Reactivos deteriorados ➔ Comprobar la integridad de los reactivos ➔ Póngase en contacto con su proveedor si sospecha que existe algún problema - El punto no aparece en la tira ➔ Cuente el número de puntos de la tira; si no es correcto, póngase en contacto con su proveedor
CO ausente	- Reactivos deteriorados ➔ Compruebe la integridad de los reactivos, y póngase en contacto con su distribuidor si sospecha que existe algún problema - El punto no aparece en la tira ➔ Cuente el número de puntos presentes en la tira y póngase en contacto con su distribuidor si es un número incorrecto
Uniones no específicas, un nivel de fondo elevado o un valor de CO elevado	Puede sospecharse la presencia de un contaminante o sustancia interferente en la muestra del paciente ➔ Repetir la prueba y confirmar el resultado mediante otro método

	Póngase en contacto con su distribuidor para cualquier otra solicitud de asistencia técnica.
No se puede leer el código de barras de las tiras o cartuchos	Existe un problema de fabricación, póngase en contacto con su distribuidor
El contenido del kit no es correcto	Existe un problema de fabricación, póngase en contacto con su distribuidor
Resultados positivos para todos los biomarcadores del kit	Existe un problema con los reactivos; póngase en contacto con su distribuidor

NOTA:

Los principales riesgos residuales del kit, tal como se indica en el análisis de riesgos del kit tras su diseño (después de la mitigación), son los siguientes:

1) Riesgo de resultados falsos debidos a un error de pipeteado (suero equivocado)

2) Riesgo de resultados falsos debidos a la presencia de una sustancia interferente en la muestra

11. RENDIMIENTOS

11.1 Repetibilidad y reproducibilidad

Se analizaron muestras de referencia para cada anticuerpo en series sucesivas estadísticamente representativas, tanto en la misma sesión de análisis como en diferentes sesiones y entre lotes distintos, para calcular las variaciones intraensayo, interensayo e interlote, respectivamente.

En todos los casos, las variaciones de la intensidad del color, cuando se semicuantificaron con el Neptune Quantification Software, estuvieron dentro de los siguientes límites esperados:

CV ≤ 10 % (intraensayo)

CV ≤ 15 % (interensayo)

CV ≤ 20 % (interlote)

11.2 Sensibilidad analítica

Intervalo de medición (resultados semicuantificados): De 0 UA (negativo) a 100 UA (positivo alto).

Límite de detección: el valor más pequeño que puede medirse en la prueba es 5 UA (un valor que se considera dudoso según el algoritmo de interpretación; véase el apartado 10.2).

Como no está disponible ningún estándar internacional para los autoanticuerpos, la veracidad de la medición y la linealidad no son aplicables a este producto.

11.3 Especificidad analítica

1. Las principales sustancias interferentes conocidas se sometieron a análisis con cada uno de los biomarcadores del presente kit.

   Para cada concentración de sustancia interferente analizada, la diferencia entre el resultado de la muestra sin la sustancia interferente y el resultado obtenido en presencia de dicha sustancia no fue superior al 15 %.

Sustancia interferente	**Concentración máxima**	**Concentración intermedia**	**Concentración mínima**	**Diferencia < 15 %**
Bilirrubina	100 mg/dl	50 mg/dl	25 mg/dl	Sí
Hemoglobina	200 mg/dl	100 mg/dl	50 mg/dl	Sí
Colesterol	224,3 mg/dl	112 mg/dl	56 mg/dl	Sí
IgM antifactor reumatoide	~ 500 UI/ml	~ 300 UI/ml	~ 100 UI/ml	Sí

   Nota: Es imposible analizar todas las posibles sustancias interferentes descritas en la bibliografía. Siempre existe la posibilidad de que se produzcan otras interferencias, como por ejemplo las inducidas por fármacos.

2. La alta especificidad analítica de la prueba está garantizada por la calidad del antígeno utilizado. Este kit detecta anticuerpos IgG contra los antígenos M2/nPDC, LKM1, LC1, SLA y actina F. No se han observado reacciones cruzadas con otros autoanticuerpos.

11.4 Sensibilidad y especificidad clínicas

La sensibilidad y la especificidad se han calculado a partir de los resultados combinados obtenidos con controles EQAS positivos y negativos clínicamente definidos y a partir de datos históricos (evaluación clínica externa en pacientes clínicamente definidos como positivos y negativos). Estas muestras caracterizadas (positivas o negativas para anticuerpos específicos confirmadas por laboratorios y/o métodos de referencia) se analizaron de acuerdo con las instrucciones de la prueba. Puede solicitarse un informe clínico detallado.

SENSIBILIDAD:

El porcentaje se determina mediante el siguiente cálculo:

$$Sensibilidad = \frac{Resultados\ verdaderos\ positivos}{Resultados\ verdaderos\ positivos + resultados\ falsos\ negativos}$$

Antígeno	**Resultados verdaderos positivos**	**Resultados falsos negativos**	**Sensibilidad (%)**
M2/nPDC	42	0	> 99
LKM1	12	0	> 99
LC1	3	0	> 99
SLA	3	0	> 99
Actina F	12	1	92

ESPECIFICIDAD:

El porcentaje se determina mediante el siguiente cálculo:

$$Especificidad = \frac{Resultados\ verdaderos\ negativos}{Resultados\ verdaderos\ negativos\ +\ resultados\ falsos\ positivos}$$

Antígeno	**Resultados verdaderos negativos**	**Resultados falsos positivos**	**Especificidad (%)**
M2/nPDC	109	0	> 99
LKM1	119	0	> 99
LC1	29	0	> 99
SLA	30	0	> 99
Actina F	137	0	> 99

Nota: Los valores de sensibilidad y especificidad del 100 % están estrechamente relacionados con las cohortes de muestras utilizadas en las evaluaciones clínicas. En teoría, un kit de diagnóstico no debería tener una sensibilidad o especificidad del 100 % (al menos > 99 %).

11.5 Valores diagnósticos de los autoanticuerpos

Anti-M2/nPDC	Los anti-M2/nPDC son anticuerpos marcadores de la colangitis biliar primaria (CBP) y son detectables en cerca del 95 % de los casos. Cuentan para los tres criterios diagnósticos de CBP. Aunque tienen una alta especificidad para la CBP, los anti-M2/nPDC también se pueden detectar en pacientes con enfermedades reumáticas inflamatorias crónicas. Se cree que estos pacientes presentan un mayor riesgo de desarrollar CBP, además de la enfermedad subyacente. En particular, en la variante CREST de la esclerosis sistémica anti-M2/nPDC positiva existe un mayor riesgo de desarrollar CBP (Fregeau *et al.*, 1988; Zurgil *et al.*, 1992). En pacientes con LES, la presencia de anti-M2/nPDC se asocia de forma significativa a un aumento de la aminotransferasa (Li *et al.*, 2006).

	Los anti-M2/nPDC son detectables en el 3-6 % de los pacientes con hepatitis autoinmunitaria (HAI) tipo 1. La mayoría de las veces son casos de síndrome de solapamiento HAI/CBP. Debe considerarse la existencia de solapamiento HAI/CBP cuando el cociente ALT/aminotransferasa es inferior a 1,5, la IgG está elevada y se detectan SMA con títulos superiores a 1:80 (Bowlus & Gershwin, 2014). Los anti-M2/nPDC pueden ser predictivos. Pueden aparecer años antes de que se manifieste una CBP. Las personas con niveles de anticuerpos anti-M2/nPDC persistentemente altos tienen mayor riesgo de desarrollar una CBP. Según estudios prospectivos, el 76 % de los pacientes asintomáticos positivos para anti-M2/nPDC son diagnosticados de CBP durante un período de observación de 11 a 24 años (Metcalf *et al*., 1996). La prevalencia de anti-M2/nPDC en familiares de primer grado de pacientes con CBP es alta (13,1 %) (Nakamura *et al*., 2014). Los títulos de anti-M2/nPDC no cambian con el tiempo y no están relacionados con la gravedad o la progresión de la enfermedad (Benson *et al*., 2004). Por otra parte, en algunos grupos se ha visto que el título de anti-M2/nPDC disminuye con el tratamiento con AUDC (Nakamura *et al*., 2014). Los anti-M2/nPDC persisten después de un trasplante de hígado.
Anti-LKM1	Los anticuerpos anti-LKM1 son anticuerpos marcadores de la *hepatitis autoinmunitaria (HAI) tipo 2* y están incluidos en los criterios diagnósticos para la HAI del Grupo Internacional de Hepatitis Autoinmunitaria, con una sensibilidad del 90-95 % en pacientes jóvenes (principalmente). También forman parte de los criterios simplificados para el diagnóstico de la HAI. Los pacientes con *HAI tipo 2* suelen ser negativos para ANA y SMA. En la *colangitis biliar primaria (CBP)* y la *colangitis esclerosante primaria (CEP),* raramente se detectan anticuerpos LKM1. Los anticuerpos LKM1 se detectan en el ~50-60 % de los casos junto con anticuerpos anti-LC1, aunque también se pueden detectar de forma aislada.
Anti-LC1	Los anticuerpos anti-LC1 son detectables en el 30-59 % de los pacientes con *hepatitis autoinmunitaria (HAI) tipo 2* y son un criterio diagnóstico del Grupo Internacional de Hepatitis Autoinmunitaria. Se encuentran principalmente en niños y pacientes jóvenes, y con frecuencia están asociados a los anticuerpos anti-LKM1. En el 50-60 % de los pacientes positivos para los anticuerpos anti-LKM1 también se detectan anticuerpos anti-LC1 como un segundo anticuerpo marcador de *HAI tipo 2*. Sin embargo, en el ~10 % de los pacientes con HAI tipo 2, los anticuerpos anti-LC1 son los únicos anticuerpos marcadores que se detectan. En la *HAI tipo 2 pediátrica*, los anticuerpos anti-LC1 son más frecuentes (59 %) que en la población adulta (28,6 %).
Anti-SLA	Los anticuerpos anti-SLA/LP tienen una alta especificidad para la *hepatitis autoinmune (HAI) tipo 3*. Aunque existe controversia sobre la definición de la *HAI tipo 3*, ya que no es distinta de la *HAI tipo 1* desde el punto de vista clínico y terapéutico, constituye claramente una entidad separada debido a la presencia de anticuerpos anti-SLA/LP. Se ha comunicado que su sensibilidad diagnóstica es del 19-33 %. Su valor predictivo positivo es de casi el 100 %.
Anti-actina F	Dado que los anticuerpos anti-actina F en niveles altos son anticuerpos marcadores, forman parte de los criterios de diagnóstico del Grupo Internacional de Hepatitis Autoinmunitaria (tres puntos en el sistema de puntuación si el nivel es > 1: 80, dos puntos si es 1:80 y un punto si es 1:40) para la *hepatitis autoinmunitaria (HAI) tipo 1.* También forman parte de los criterios simplificados para el diagnóstico de la HAI. Muy a menudo están asociados a los anticuerpos antinucleares (ANA), aunque pueden ser positivos de forma aislada en aprox. el 35 % de los pacientes con *HAI tipo 1*. La sensibilidad y especificidad diagnósticas para la HAI tipo 1 son del ~80 % y el 96 % respectivamente. Por consiguiente, unos resultados negativos para anti-actina F no permiten descartar por completo la HAI. Los títulos tienen una correlación limitada con la actividad de la enfermedad. Solo títulos altos, > 1:80, pueden relacionarse con la actividad de la enfermedad. Ni el título de anticuerpos en el momento del diagnóstico ni el comportamiento de los anticuerpos en el curso de la enfermedad son marcadores pronósticos. Nota: En niños, un título de 1:20 puede ser relevante para el diagnóstico. La mayoría de los títulos bajos de anti-actina F pueden observarse en infecciones víricas, como *mononucleosis infecciosa o hepatitis C crónica* (8-10 %), pero también en *enfermedades reumáticas, la colangitis biliar primaria (CBP)* (22 %) y pacientes con *hepatopatía alcohólica* (3-16 %) y *enfermedad neoplásica*. La prevalencia en personas sanas es de aprox. el 5 %.

Referencias bibliográficas:

1: Chen BH, Wang QQ, Zhang W, Zhao LY, Wang GQ. Screening of anti-mitochondrial antibody subtype M2 in residents at least 18 years of age in an urban district of Shanghai, China. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016 May;20(10):2052-60. PMID: 27249604.

2: Pang SY, Dai YM, Zhang RZ, Chen YH, Peng XF, Fu J, Chen ZR, Liu YF, Yang LY, Wen Z, Yu JK, Liu HY. Autoimmune liver disease-related autoantibodies in patients with biliary atresia. World J Gastroenterol. 2018 Jan 21;24(3):387-396. doi: 10.3748/wjg.v24.i3.387. PMID: 29391761; PMCID: PMC5776400.

3: Zandanell S, Strasser M, Feldman A, Tevini J, Strebinger G, Niederseer D, Pohla-Gubo G, Huber-Schönauer U, Ruhaltinger S, Paulweber B, Datz C, Felder TK, Aigner E. Low rate of new-onset primary biliary cholangitis in a cohort of anti-mitochondrial antibody-positive subjects over six years of follow-up. J Intern Med. 2020 Apr;287(4):395-404. doi: 10.1111/joim.13005. Epub 2019 Dec 4. PMID:31802567; PMCID: PMC7154539.

4: Calise SJ, Zheng B, Hasegawa T, Satoh M, Isailovic N, Ceribelli A, Andrade LEC, Boylan K, Cavazzana I, Fritzler MJ, de la Torre IG, Hiepe F, Kohl K, Selmi C, Shoenfeld Y, Tincani A, Chan EKL; IUIS Autoantibody Standardization Committee. Reference standards for the detection of anti-mitochondrial and anti-rods/rings autoantibodies. Clin Chem Lab Med. 2018 Sep 25;56(10):1789-1798. doi: 10.1515/cclm-2017-1152. PMID: 29478040; PMCID: PMC8128709.

5: Amin K, Rasool AH, Hattem A, Al-Karboly TA, Taher TE, Bystrom J. Autoantibody profiles in autoimmune hepatitis and chronic hepatitis C identifies similarities in patients with severe disease. World J Gastroenterol. 2017 Feb 28;23(8):1345-1352. doi: 10.3748/wjg.v23.i8.1345. PMID: 28293081; PMCID: PMC5330819.

6: Deng CW, Wang L, Fei YY, Hu CJ, Yang YJ, Peng LY, Zeng XF, Zhang FC, Li YZ. Exploring pathogenesis of primary biliary cholangitis by proteomics: A pilot study. World J Gastroenterol. 2017 Dec 28;23(48):8489-8499. doi: 10.3748/wjg.v23.i48.8489. PMID: 29358857; PMCID: PMC5752709.

7: Yannick Chantrana, Christophe Corpechotb, David Haddouk, et al., Groupe d'étude de l'auto-immunité (GEAI), 8eme Colloque, Anticorps anti-gp210 et anticorps anti-Sp100 dans la cirrhose biliaire primitive: une association de très mauvais pronostic, n°464 bis, juillet/août 2014

8: Karsten Conrad, Werner Schössler, Falk Hiepe, Marvin J. Fritzler, Book "Autoantibodies in organ Autoimmune Diseases", Volume 8, second edition – 2017

9: Vanderlocht J, van der Cruys M, Stals F, Bakker-Jonges L, Damoiseaux J. Multiplex autoantibody detection for autoimmune liver diseases and autoimmune gastritis. J Immunol Methods. 2017 Sep;448:21-25. doi: 10.1016/j.jim.2017.05.003. Epub 2017 May 16. PMID: 28522403.

12. LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos con esta prueba confirmatoria dependen del rendimiento intrínseco del kit y deben considerarse como una ayuda para el diagnóstico final, teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante una técnica de referencia y los datos clínicos del paciente.
2. En caso de muestras hiperlipémicas, se recomienda centrifugar antes de pipetear los 10 µl de muestra; este pipeteo debe realizarse en el sobrenadante.
3. El diagnóstico de la hepatitis autoinmunitaria (HAI) se basa en la presencia de hipergammaglobulinemia, citólisis, colestasis, autoanticuerpos característicos de la HAI o la CBP (colangitis biliar primaria) y lesiones histológicas inflamatorias y necróticas.
4. La concentración de autoanticuerpos de una muestra de suero no es relativa a los resultados obtenidos mediante el kit.
5. No existe relación entre la concentración de los diferentes autoanticuerpos detectada mediante el kit y la gravedad de las enfermedades autoinmunitarias asociadas.

Versión B
Última revisión: 03/2025

DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2
BE-1348 Louvain-la-Neuve - BELGIUM

D-tek s.a., Parc Initialis
Rue René Descartes 19
BE-7000 Mons – BELGIUM