

DIASpot Polymyositis/Scleroderma8 IgG

Order Code: KAPDTPMS8

1. INTENDED USE

DIASpot Polymyositis/Scleroderma8 IgG is an immunodot kit intended for the detection, in human sera only, of IgG autoantibodies against the antigens Jo-1, PL-7, PL-12, SRP-54, Mi-2, Ku, PM-Scl 100 and Scl-70.

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*).

Detection of the different IgG autoantibodies can be either qualitative (see point 10.1) or semi-quantitative (see point 10.2).

The test is intended for a large, routine population. This kit is strictly reserved for professional use in clinical analysis laboratories. Prior training is strongly recommended (please contact your distributor).

It can only be used manually on a platform shaker or in an open automated immunodot processing system, programmed according to the pipetting scheme described in point 9.2.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

This kit and all its components are intended for exclusive manual use.

The test is based on the principle of an Enzyme Immunoassay. The strips are composed of a membrane fixed onto a plastic support. In the assay procedure, the strips are incubated with diluted patient serum. If present in the sample, the patient's autoantibodies bind to the specific antigen on the membrane. Unbound or excess antibodies are removed by washing in the next step. Then, human anti-IgG immunoglobulins conjugated with alkaline phosphatase are incubated with the strips and bind to the antigen-antibody complexes on the membrane surface. After a second washing step to remove excess conjugate, the chromogen/substrate solution is added, resulting in the appearance of an insoluble coloured product (purple) that precipitates at the site of the enzymatic reaction. The colour intensity is directly proportional to the quantity of antibodies present in the sample.

The kit contains 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

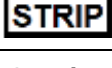
TO BE DILUTED:	(10 x) Wash Solution	1 x 40 ml - 10x concentrated (colourless) Contains: H ₂ O • TBS • NaCl • Tween • Preservatives	
READY TO USE:	Dot strips	24 units (each strip is for single use) 10 dots each: 1 negative control (CO) 8 antigens 1 positive control (RC)	
	Sample Diluent	1 x 40 ml (yellow) Contains: H ₂ O • TBS • NaCl • Tween • BSA • Preservatives • Dye	
	Conjugate	1 x 40 ml (red) Contains: H ₂ O • TBS • NaCl • KCl • MgCl ₂ • AP-conjugated goat anti-human IgG • Preservatives • Dye	
	Substrate	1 x 40 ml (brown bottle, pale yellow solution) Contains: H ₂ O • Preservatives • MgCl ₂ • TBS • NBT • BCIP • NBT Stabilizer	
	Incubation trays	3 units with 8 wells for incubation	

Abbreviations in alphabetic order:

AP = Alkaline Phosphatase; BCIP = Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphate; BSA = Bovine Serum Albumin; KCl = Potassium Chloride; MgCl₂ = 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 Mark + Notified Body
	In Vitro Diagnostic Medical Device		For 24 uses
	To be stored from 2-8°C		Reference
	Batch Number		To be protected from direct sunlight
	Use-by date		Manufacturer
	Cartridge		Caution
	Strip		

3.2 Antigens used

Jo-1	Histidyl-tRNA synthetase (recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells)
PL-7	Threonyl-tRNA synthetase (recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells)
PL-12	Alanyl-tRNA synthetase (recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells)
SRP-54	54 kD subunit of the signal recognition particle (SRP) (recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells)
Mi-2	CHD4 protein (chromodomain helicase DNA binding protein), subunit Mi-2 beta (recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells)
Ku	Regulatory subunit of DNA-dependent protein kinase (70/80 kD heterodimer) (recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells)
PM-Scl 100	Polymyositis-Scleroderma antigen (100 kD subunit) (recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells)
Scl-70	DNA topoisomerase I (recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells)

3.3 Reactive ingredients

Substance	Origin	Intend purpose in Overlap PM/Scl kits	Concentration in Overlap PM/Scl 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.
Jo-1 antigen	recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One Jo-1 spot = 0,5µl on each strip	>80%
PL-7 antigen	recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One PL-7 spot = 0,5µl on each strip	>80%
PL-12 antigen	recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One PL-12 spot = 0,5µl on each strip	>80%
SRP-54 antigen	recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One SRP-54 spot = 0,5µl on each strip	>80%
Mi-2 antigen	recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One Mi-2 spot = 0,5µl on each strip	>80%
Ku antigen	recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One Ku spot = 0,5µl on each strip	>80%
PM-Scl 100 antigen	recombinant, human, expressed in Baculovirus-infected Sf9 cells	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One PM-Scl 100 spot = 0,5µl on each strip	>80%
Scl-70 antigen	recombinant, human, expressed in	Biomarker (antigen) coated on strips	<0,5 mg/ml One Scl-70 spot = 0,5µl on each strip	>80%

	Baculovirus-infected Sf9 cells			
Protein L	Bacterial (from <i>Peptostreptococcus magnus</i>)	Reactive (positive) control	0,01 mg/ml One RC spot = 0,5µl on each strip	>95%
Streptavidin-Alkaline Phosphatase	Bacterial (from <i>Streptomyces avidinii</i>)	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

Platform shaker / Micropipettes / Timer / Graduated cylinder / Distilled or deionised water / Tweezers / Absorbent and/or filter paper.

5. STORAGE

The reconstituted wash solution is stable for at least one month at 2-8°C. Reagents and strips can be stored at 2-8°C until the expiry date indicated on each vial or tube.

Place unused strips back into the provided tube, seal it and store at 2-8°C. Chromogen/Substrate (NBT/BCIP) shall be stored at 2-8°C.

When stored properly, all test kit components are stable until the indicated expiry date.

6. SAFETY PRECAUTIONS

- All reagents are for in vitro diagnostic and professional use only. The test kit should be processed by trained technical staff only.
- The reagents in the kit are considered as not 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 reagent vials 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 contains 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. RECOMMENDATIONS

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:

The dots are precoloured blue on the strips, ensuring that all antigens have been dotted correctly onto the membrane. This blue coloration disappears during the first step of the incubation. During incubation with the wash solution, a faint pink background coloration appears on the membrane and disappears upon drying at the end of the procedure.

During the procedure, agitation of the incubation tray is necessary to ensure efficient circulation of fluids over the membrane. A Rocking platform is the shaker of choice. Be sure to adjust the movement of the shaker in such a way that no spilling of solutions or cross-contamination between the wells can occur.

After each filling of the wells with solution, agitate manually the incubation tray until the strips are completely immersed in order to remove air bubbles which may be trapped under the strip. Alternatively, floating strips may be forced into the solution by pushing down (with tweezers or pipette tip) on the upper part of the strip (plastic label zone).

Avoid touching the membrane zone of the strip with fingers, tweezers or pipette tips. Always use the plastic label zone for handling or manipulation. The whole procedure must be run **at room temperature (18-25°C)**.

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*).

9.1 Reagents preparation

1. Allow all components to equilibrate at room temperature **(18-25°C)** before use.
2. **Dilute** the concentrated **wash solution 10x** with **distilled water**.

Prepare 15 ml diluted wash solution per strip tested

Example: 1,5 ml concentrated wash solution + 13,5 ml distilled water for one strip.

Do not substitute reagents or mix strips with different batch numbers this may lead to variations in the results.

9.2 Pipetting flow chart

1. **Place** one **strip** per patient into the wells, blue dots **facing up**.
2. Add **2 ml diluted wash solution** per well. **Incubate** (shake) **for 10 min**.
Upon correct incubation, the blue coloration of the dots completely disappears.
If not prolong the procedure until the colour of the dots fades completely.
3. **Discard** solution from the wells.
Remove liquid by slowly inverting the plate. The strips will adhere to the bottom of the wells. Dry the edge of the tray with absorbent paper.
4. Add **1,5 ml sample diluent** per well.
5. Add **10 µl patient sample** per well. **Incubate** (shake) **for 30 min**.
Avoid touching the membrane with the pipette tip. Preferentially dispense the sample into the solution over the upper part of the strip (plastic label zone).
Note: Steps 4 and 5 can be combined by pre-diluting the sample in a glass or plastic tube (1,5 ml sample diluent + 10 µl patient sample). Mix (Add to the well)
6. **Discard** solution from the wells.
Remove liquid by slowly inverting the plate. The strips will adhere to the bottom of the wells. Dry the edge of the tray with absorbent paper.
7. **Wash 3 x 3 minutes** with **1,5 ml diluted wash solution** per well (shake).

- Following each wash step remove liquid from the wells by slowly inverting the plate. The strips will adhere to the bottom of the wells. Dry the edges of the tray with absorbent paper*
8. Add **1,5 ml Conjugate** per well. **Incubate** (shake) **for 30 min.**
 9. **Discard** solution from the wells.
Remove liquid by slowly inverting the plate. The strips will adhere to the bottom of the wells. Dry the edge of the tray with absorbent paper
 10. **Wash 3 x 3 min.** with **1,5 ml diluted wash solution** (shake)
Following each wash step remove liquid from the wells by slowly inverting the plate. The strips will adhere to the bottom of the wells. Dry the edges of the tray with absorbent paper.
 11. Add **1,5 ml Substrate** per well. **Incubate** (shake) **for 10 min.**
 12. **Discard** solution from the wells.
Remove liquid by slowly inverting the plate. The strips will adhere to the bottom of the wells. Dry the edge of the tray with absorbent paper.
 13. **Wash 1 x 3 min.** with **1,5 ml diluted wash solution** per well to stop the reaction.
 14. **Collect** the strips from the wells and allow them to dry for 30 minutes on absorbent paper. The interpretation must be done in the 24 hours following the test processing.

10. INTERPRETATION OF RESULTS

A visual (qualitative) interpretation of the results of the kit is possible, however the use of the Neptune Scanner and the Neptune Quantification Software is generally recommended for more precision and 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. Peel off the cover of the adhesive on the back side of each strip and attach strips dots face up onto the marked fields of the interpretation sheet provided with the kit. This will indicate the respective positions of the different controls and antigens on the membrane.
2. The first upper dot (**Positive Control Dot**) 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.
3. 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 (material needed: clamp, empty stripholders)

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:

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

1. Prepare a clamp and load it with as many empty stripholders as there are strips to analyse. Carefully insert a strip into each stripholder, RC showing upwards.
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 <i>Analytical sensitivity and specificity</i>) - 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 <i>Repeatability and Reproducibility</i>)
Contamination between neighbouring strips	- Use - incorrect pipetting of serum → repeat the test
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 distributor 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.

Strips not correctly labelled	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 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

2. Note: It is impossible to test all the possible interfering substances described in the literature. Other interferences, amongst others drug-induced interferences, are possible. The high analytical specificity of the test is guaranteed by the quality of the antigen used. This kit detects IgG antibodies against Jo-1, PL-7, PL-12, SRP-54, Mi-2, Ku, PM-Scl 100 and Scl-70. 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:			
$\text{Sensitivity} = \frac{\text{True Positive Results}}{\text{True Positive Results} + \text{False Negative Results}}$			
Antigen	True Positive Results	False Negative Results	Sensitivity (%)
Jo-1	57	0	>99
PL-7	1	0	>99
PL-12	2	0	>99
SRP-54	21	0	>99
Mi-2	20	0	>99
Ku	22	2	92
PM-Scl 100	3	0	>99
Scl-70	12	0	>99

Specificity:			
The percentage is established with the following calculation:			
$\text{Specificity} = \frac{\text{True Negative Results}}{\text{True Negative Results} + \text{False Positive Results}}$			
Antigen	True negative results	False positive results	Specificity (%)
Jo-1	162	0	>99
PL-7	79	0	>99
PL-12	78	0	>99
SRP-54	33	0	>99
Mi-2	37	0	>99
Ku	26	0	>99
PM-Scl 100	31	0	>99
Scl-70	157	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-Jo-1	Diagnostic marker for idiopathic (autoimmune) myositis. Diagnostic specificity of 100%, diagnostic sensitivity of 24-30% for auto-immune idiopathic myositis.
Anti-PL-7	Diagnostic marker for idiopathic myositis, sensitivity of 2-3%. Highly associated with the presence or development of interstitial lung disease (ILD).
Anti-PL-12	Diagnostic marker for idiopathic myositis, sensitivity of 2-3%. Highly associated with the presence or development of interstitial lung disease (ILD).
Anti-SRP-54	Diagnostic marker of polymyositis, specificity of 100%, sensitivity of 4-6% Differential diagnostic and prognostic marker: rapid-progressive proximal muscle weakness.
Anti-Mi-2	Diagnostic marker for idiopathic myositis, with a diagnostic sensitivity of 4-18%. Detectable in 15-31% of patients with adult dermatomyositis, and in 10-15% of those with juvenile dermatomyositis. Prognostic marker for a relatively mild clinical course, but associated with an increased risk of cancer. Detectable in the early stages of myositis development.
Anti-Ku	Found in 23% of patients with "primary" pulmonary hypertension Found in 1.8 à 23% of patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Found in 1.2 à 14 % of patients with systemic sclerosis (SSc). Found in 2 à 33% of patients with an overlap syndrome with myositis.
Anti-PM-Scl 100	Diagnostic marker for connective tissue diseases with myositis and symptoms of systemic sclerosis. Diagnostic specificity of 50-70% for polymyositis/scleroderma overlap syndrome, of 20% for idiopathic myositis and of 10% for systemic Sclerosis (SSc). Diagnostic sensitivity of 24-55% for polymyositis/scleroderma overlap syndrome, of 8-12% in patients with idiopathic myositis and of 1-16% for systemic Sclerosis (SSc).
Anti-Scl-70	Diagnostic marker for Systemic Sclerosis (SSc) Diagnostic specificity of 99%, sensibility of 10 % for limited SSc and up to 65% for diffuse SSc.

Publication references :

1: Alderuccio F, Chan EK, Tan EM. Molecular characterization of an autoantigen of PM-Scl in the polymyositis/scleroderma overlap syndrome: a unique and complete human cDNA encoding an apparent 75-kD acidic protein of the nucleolar complex. *J Exp Med.* 1991 Apr 1;173(4):941-52. doi: 10.1084/jem.173.4.941. PMID: 2007859; PMCID: PMC2190817.

2: Mahler M, Rajmakers R, Dähnrich C, Blüthner M, Fritzler MJ. Clinical evaluation of autoantibodies to a novel PM/Scl peptide antigen. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):R704-13. doi: 10.1186/ar1729. Epub 2005 Apr 1. PMID: 15899056; PMCID: PMC1174964.

3: Karsten Conrad, Werner Schössler, Falk Hiepe, Marvin J. Fritzler, Book "Autoantibodies in systemic Autoimmune Diseases", Volume 2, third edition – 2015.

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. Skin tests can help in the overlap syndrome diagnosis. Symptoms vary but they mostly involve skin disorders. The signs to look for include Raynaud's phenomenon, arthritis, myositis and scleroderma. Visual symptoms include discolouring of the skin and painful swelling.
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 ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2
BE-1348 Louvain-la-Neuve - BELGIUM



Version B
Last revision: 03/2025

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

DIASpot Polymyositis/Scleroderma⁸ IgG

Código para pedidos: KAPDTPMS8

1. USO PREVISTO

DIASpot Polymyositis/Scleroderma⁸ IgG es un kit de inmunotransferencia por puntos para la detección, exclusivamente en suero humano, de autoanticuerpos IgG contra los antígenos Jo-1, PL-7, PL-12, SRP-54, Mi-2, Ku, PM-Scl 100 y Scl-70.

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»).

La detección de los diferentes autoanticuerpos IgG puede ser cualitativa (véase el apartado 10.1) o semicuantitativa (véase el apartado 10.2).

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. Se recomienda encarecidamente impartir formación al personal antes de utilizar este kit (póngase en contacto con su distribuidor).

Solo puede utilizarse de forma manual en un agitador de plataforma o en un sistema abierto de procesamiento automático de inmunotransferencia por puntos que se programe según el esquema de pipeteado indicado en el apartado 9.2.

2. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Este kit y todos sus componentes están destinados exclusivamente al uso manual.

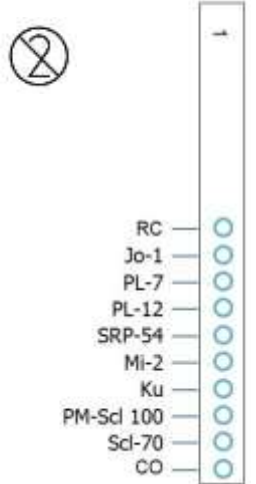
La prueba se basa en el principio de un inmunoensayo enzimático. Las tiras están compuestas por una membrana fijada a un soporte plástico. En el procedimiento de ensayo, las tiras se incuban con suero del paciente diluido. Si hay autoanticuerpos presentes en la muestra, se unirán al antígeno específico en la membrana. Los anticuerpos no unidos o en exceso se eliminan mediante un lavado en el siguiente paso. A continuación, se incuban inmunoglobulinas humanas anti-IgG conjugadas con fosfatasa alcalina con las tiras, que se unen a los complejos antígeno-anticuerpo en la superficie de la membrana. Tras un segundo lavado para eliminar el exceso de conjugado, se añade la solución de cromógeno/sustrato, lo que provoca la aparición de un producto coloreado insoluble (violeta) que precipita en el lugar de la reacción enzimática. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes 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

PARA DILUIR:	(10 unidades) Solución de lavado	1 x 40 ml - concentrado (10 x) (incolore) Contenido: H ₂ O • TBS • NaCl • Tween • Conservantes	
LISTO PARA USAR:	Tiras de puntos	24 unidades (cada tira es de un solo uso) 10 puntos en cada una: 1 control negativo (CO) 8 antígenos 1 control positivo (RC)	
	Diluyente de muestras	1 x 40 ml (amarillo) Contenido: H ₂ O • TBS • NaCl • Tween • BSA • Conservantes • Colorante	
	Conjugado	1 x 40 ml (rojo) Contenido: H ₂ O • TBS • NaCl • KCl • MgCl ₂ • Anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con AP • Conservantes • Colorante	
	Sustrato	1 x 40 ml (frasco marrón, solución de color amarillo pálido) Contenido: H ₂ O • Conservantes • MgCl ₂ • TBS • NBT • BCIP • Estabilizante de NBT	
	Bandejas de incubación	3 unidades con 8 pocillos para la incubación	

Abreviaturas por orden alfabético:

AP = fosfatasa alcalina; BCIP = bromo-cloro-indolilfosfato; BSA = albúmina de suero bovino; KCl = cloruro de potasio; MgCl₂ = 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		Marca CE + Organismo notificado
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>		Para 24 usos
	Conservar a 2-8 °C		Referencia
	Número de lote		Proteger de la luz solar directa
	Fecha de caducidad		Fabricante
	Cartucho		Precaución
	Tira		

3.2 Antígenos utilizados

Jo-1	Histidil-ARNt-sintetasa (recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus)
PL-7	Treonil-ARNt-sintetasa (recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus)
PL-12	Alanil-ARNt-sintetasa (recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus)
SRP-54	Subunidad de 54 kD de la partícula de reconocimiento de señales (PRS) (recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus)
Mi-2	Proteína CHD4 (helicasa con cromodominio de unión a ADN 4), subunidad Mi-2 beta (recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus)
Ku	Subunidad reguladora de la proteína cinasa dependiente del ADN (heterodímero de 70/80 kD) (recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus)
PM-Scl 100	Antígeno de polimiositis-esclerodermia (subunidad de 100 kD) (recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus)
Scl70	ADN-topoisomerasa I (recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus)

3.3 Componentes reactivos

Sustancia	Origen	Uso previsto en los kits «Overlap PM/Scl»	Concentración en los kits «Overlap PM/Scl»	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 Jo-1	recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus	Biomarcador (antígeno) como recubrimiento de las tiras	< 0,5 mg/ml Un punto de Jo-1 = 0,5 µl en cada tira	> 80%
Antígeno PL-7	recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus	Biomarcador (antígeno) como recubrimiento de las tiras	< 0,5 mg/ml Un punto de PL-7 = 0,5 µl en cada tira	> 80%
Antígeno PL-12	recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus	Biomarcador (antígeno) como recubrimiento de las tiras	< 0,5 mg/ml Un punto de PL-12 = 0,5 µl en cada tira	> 80%
Antígeno SRP-54	recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus	Biomarcador (antígeno) como recubrimiento de las tiras	< 0,5 mg/ml Un punto de SRP-54 = 0,5 µl en cada tira	> 80%
Antígeno Mi-2	recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus	Biomarcador (antígeno) como recubrimiento de las tiras	< 0,5 mg/ml Un punto de Mi-2 = 0,5 µl en cada tira	> 80%
Antígeno Ku	recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus	Biomarcador (antígeno) como recubrimiento de las tiras	< 0,5 mg/ml Un punto de Ku = 0,5 µl en cada tira	> 80%
Antígeno PM-Scl 100	recombinante, humano, expresado en células Sf9 infectadas con baculovirus	Biomarcador (antígeno) como recubrimiento de las tiras	< 0,5 mg/ml Un punto de PM-Scl 100 = 0,5 µl en cada tira	> 80%
Antígeno Scl-70	recombinante, humano, expresado en células	Biomarcador (antígeno) como	< 0,5 mg/ml	> 80%

	Sf9 infectadas con baculovirus	recubrimiento de las tiras	Un punto de Scl-70 = 0,5 µl en cada tira	
Proteína L	Bacteriano (de <i>Peptostreptococcus magnus</i>)	Control reactivo (positivo)	0,01 mg/ml Un punto de RC = 0,5 µl en cada tira	> 95%
Estreptavidina con fosfatasa alcalina	Bacteriano (de <i>Streptomyces avidinii</i>)	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

Agitador de plataforma, micropipetas, temporizador, matraz aforado, agua destilada o desionizada, pinzas, papel absorbente y/o papel de filtro.

5. CONSERVACIÓN

La solución de lavado reconstituida es estable durante al menos un mes a 2-8 °C. Los reactivos y las tiras pueden conservarse a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en cada tubo o vial.

Vuelva a colocar las tiras no utilizadas en el tubo suministrado, cierre el tubo herméticamente y consérvelo a 2-8 °C. El cromógeno/sustrato (NBT/BCIP) debe conservarse a 2-8 °C.

Si se conservan correctamente, todos los componentes del kit de la prueba permanecerán estables hasta la fecha de caducidad indicada.

6. MEDIDAS DE SEGURIDAD

- 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.
- 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 de las 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 de las 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 de las 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 de las 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 manipularlos exclusivamente personal cualificado y manteniendo 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 viales de reactivos 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 limitada 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:

Los puntos presentan una coloración previa azul en las tiras, lo que garantiza la correcta colocación de todos los antígenos en la membrana. Este color azul desaparece durante el primer paso de la incubación. Al realizar la incubación con la solución de lavado, en la membrana aparece una coloración rosa tenue de fondo que desaparece con el secado al final del procedimiento.

Durante el procedimiento, la bandeja de incubación debe agitarse para asegurar una circulación eficaz de los líquidos sobre la membrana. Preferiblemente, debe utilizarse un agitador con plataforma oscilante. Asegúrese de ajustar el movimiento del agitador de modo que no se produzcan derrames de soluciones ni contaminación cruzada entre los pocillos.

Cada vez que llene los pocillos con solución, agite manualmente la bandeja de incubación hasta que las tiras queden completamente sumergidas para eliminar las burbujas de aire que puedan quedar atrapadas debajo de las tiras. Alternativamente, las tiras flotantes pueden introducirse en la solución empujándolas hacia abajo (con unas pinzas o la punta de la pipeta) por la parte superior de la tira (la zona de la etiqueta de plástico).

No toque la zona de la membrana de la tira con los dedos, las pinzas o la punta de la pipeta. Utilice siempre la zona de la etiqueta de plástico para sujetar y manipular las tiras. Todo el procedimiento debe realizarse **a temperatura ambiente (18-25 °C)**.

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»).

9.1 Preparación de los reactivos

1. Deje que todos los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente (**18-25 °C**) antes de utilizarlos.

2. **Diluya la solución de lavado concentrada (10 x) con agua destilada.**

Prepare 15 ml de solución de lavado diluida por cada tira reactiva.

Ejemplo: 1,5 ml de solución de lavado concentrada + 13,5 ml de agua destilada para una tira.

No sustituya los reactivos ni mezcle tiras con números de lote diferentes, ya que esto podría dar lugar a variaciones en los resultados.

9.2 Diagrama de flujo del pipeteado

1. **Coloque** una **tira** por paciente en los pocillos, con los puntos azules **hacia arriba**.
2. Añada **2 ml** de **solución de lavado diluida** a cada pocillo. **Incube** (con agitación) **durante 10 min.**
Tras una correcta incubación, la coloración azul de los puntos debe desaparecer completamente.
En caso contrario, prolongue el procedimiento hasta que el color de los puntos desaparezca por completo.
3. **Deseche** la solución de los pocillos.
Elimine el líquido invirtiendo la placa lentamente. Las tiras se adherirán al fondo de los pocillos. Seque el borde de la bandeja con papel absorbente.
4. Añada **1,5 ml** de **diluyente de muestras** a cada pocillo.
5. Añada **10 µl** de **muestra del paciente** a cada pocillo. **Incube** (con agitación) **durante 30 min.**
No toque la membrana con la punta de la pipeta. Es preferible dispensar la muestra en la solución por la parte superior de la tira (la zona de la etiqueta de plástico).
Nota: Los pasos 4 y 5 pueden combinarse diluyendo previamente la muestra en un tubo de vidrio o plástico (1,5 ml de diluyente de muestra + 10 µl de muestra del paciente). Mezcle (añada al pocillo)
6. **Deseche** la solución de los pocillos.
Elimine el líquido invirtiendo la placa lentamente. Las tiras se adherirán al fondo de los pocillos. Seque el borde de la bandeja con papel absorbente.
7. **Lave (3 x 3 minutos)** con **1,5 ml** de **solución de lavado diluida** por pocillo (con agitación).
Después de cada paso de lavado, elimine el líquido de los pocillos invirtiendo la placa lentamente. Las tiras se adherirán al fondo de los pocillos. Seque los bordes de la bandeja con papel absorbente.
8. Añada **1,5 ml** de **conjugado** a cada pocillo. **Incube** (con agitación) **durante 30 min.**
9. **Deseche** la solución de los pocillos.
Elimine el líquido invirtiendo la placa lentamente. Las tiras se adherirán al fondo de los pocillos. Seque el borde de la bandeja con papel absorbente.
10. **Lave (3 x 3 minutos)** con **1,5 ml** de **solución de lavado diluida** (con agitación)
Después de cada paso de lavado, elimine el líquido de los pocillos invirtiendo la placa lentamente. Las tiras se adherirán al fondo de los pocillos. Seque los bordes de la bandeja con papel absorbente.
11. Añada **1,5 ml** de **sustrato** a cada pocillo. **Incube** (con agitación) **durante 10 min.**
12. **Deseche** la solución de los pocillos.
Elimine el líquido invirtiendo la placa lentamente. Las tiras se adherirán al fondo de los pocillos. Seque el borde de la bandeja con papel absorbente.
13. **Lave (1 x 3 min)** con **1,5 ml** de **solución de lavado diluida** cada pocillo para detener la reacción.
14. **Recoja** las tiras de los pocillos y déjelas secar durante 30 minutos sobre papel absorbente. La interpretación debe realizarse en las 24 horas siguientes al procesamiento de la prueba.

10. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

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

10.1 Interpretación cualitativa

1. Desprenda el adhesivo de la parte posterior de cada tira y coloque las tiras con los puntos hacia arriba sobre los campos marcados de la hoja de interpretación suministrada con el kit. Esto indicará las respectivas posiciones de los diferentes controles y antígenos en la membrana.
2. El primer punto superior (**punto de 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.
3. 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 Neptune Quantification Software y del sistema de escaneo (material necesario: pinza, soporte de tiras vacío)

El Neptune Scanner 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 Neptune Quantification 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:

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

1. Prepare una pinza y cárguela con tantos soportes de tiras vacíos como tiras a analizar. Introduzca con cuidado una tira en cada soporte de tiras, con el RC hacia arriba.
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) de 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 (cercaños 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 el 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 (véase 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 → repita la prueba -Material - presencia de sustancias interferentes en la muestra - la muestra es una mezcla de distintos sueros humanos → repita la prueba y confirme el resultado por 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 - Lectura de Neptune Quantification Software incorrecta → repita la prueba - Método - Rendimiento intrínseco del kit (véase el apartado 11.1, «Repetibilidad y reproducibilidad»)	
Contaminación entre tiras contiguas	- Uso - pipeteado incorrecto del suero → repita la prueba	
RC ausente o débil	- Uso - No se ha pipeteado suero	

	→ repita la prueba - Paciente con déficit de inmunoglobulinas → Repetir la prueba para confirmar el estado del paciente - Reactivos deteriorados → compruebe 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.
Las tiras no están etiquetadas correctamente	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 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

2. 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. La alta especificidad analítica de la prueba está garantizada por la calidad del antígeno utilizado. Este kit detecta anticuerpos IgG contra los antígenos Jo-1, PL-7, PL-12, SRP-54, Mi-2, Ku, PM-Scl 100 y Scl-70. 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:			
$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Resultados verdaderos positivos}}{\text{Resultados verdaderos positivos} + \text{resultados falsos negativos}}$			
Antígeno	Resultados verdaderos positivos	Resultados falsos negativos	Sensibilidad (%)
Jo-1	57	0	> 99
PL-7	1	0	> 99
PL-12	2	0	> 99
SRP-54	21	0	> 99
Mi-2	20	0	> 99
Ku	22	2	92
PM-Scl 100	3	0	> 99
Scl70	12	0	> 99

Especificidad:			
El porcentaje se determina mediante el siguiente cálculo:			
$\text{Especificidad} = \frac{\text{Resultados verdaderos negativos}}{\text{Resultados verdaderos negativos} + \text{resultados falsos positivos}}$			
Antígeno	Resultados verdaderos negativos	Resultados falsos positivos	Especificidad (%)
Jo-1	162	0	> 99
PL-7	79	0	> 99
PL-12	78	0	> 99
SRP-54	33	0	> 99
Mi-2	37	0	> 99
Ku	26	0	> 99
PM-Scl 100	31	0	> 99
Scl70	157	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-Jo-1	Marcador diagnóstico de la miositis idiopática (autoinmunitaria). Especificidad diagnóstica del 100% y sensibilidad diagnóstica del 24-30% para la miositis idiopática (autoinmunitaria).
Anti-PL-7	Marcador diagnóstico de la miositis idiopática, con una sensibilidad del 2-3%. Está estrechamente asociado a la presencia o desarrollo de enfermedad pulmonar intersticial (EPI).
Anti-PL-12	Marcador diagnóstico de la miositis idiopática, con una sensibilidad del 2-3%. Está estrechamente asociado a la presencia o desarrollo de enfermedad pulmonar intersticial (EPI).
Anti-SRP-54	Marcador diagnóstico de la polimiositis, con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 4-6%. Marcador de diagnóstico diferencial y marcador pronóstico de la debilidad muscular proximal de progresión rápida.
Anti-Mi-2	Marcador diagnóstico de la miositis idiopática, con una sensibilidad diagnóstica del 4-18%. Detectable en el 15-31% de los pacientes con dermatomiositis del adulto y en el 10-15% de los pacientes con dermatomiositis juvenil. Marcador pronóstico de una progresión clínica relativamente leve, pero está asociado a un mayor riesgo de cáncer. Detectable en los primeros estadios del desarrollo de la miositis.
Anti-Ku	Se detecta en el 23% de los pacientes con hipertensión pulmonar «primaria». Se detecta en el 1,8-23% de los pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Se detecta en el 1,2-14% de los pacientes con esclerosis sistémica (ES). Se detecta en el 2-33% de los pacientes con síndrome de solapamiento con miositis.
Anti-PM-Scl 100	Marcador diagnóstico de enfermedades del tejido conjuntivo con miositis y síntomas de esclerosis sistémica. Especificidad diagnóstica del 50-70% para el síndrome mixto de polimiositis/esclerodermia, del 20% para la miositis idiopática y del 10% para la esclerosis sistémica (ES). Sensibilidad diagnóstica del 24-55% para el síndrome mixto de polimiositis/esclerodermia, del 8-12% para la miositis idiopática y del 1-16% para la esclerosis sistémica (ES).
Anti-Scl70	Marcador diagnóstico de la esclerosis sistémica (ES). Especificidad diagnóstica del 99%, sensibilidad del 10% para la ES limitada y del 65% como máximo para la ES difusa.

Referencias bibliográficas:

- 1: Alderuccio F, Chan EK, Tan EM. Molecular characterization of an autoantigen of PM-Scl in the polymyositis/scleroderma overlap syndrome: a unique and complete human cDNA encoding an apparent 75-kD acidic protein of the nucleolar complex. *J Exp Med*. 1991 Apr 1;173(4):941-52. doi: 10.1084/jem.173.4.941. PMID: 2007859; PMCID: PMC2190817.
- 2: Mahler M, Rajmakers R, Dähnrich C, Blüthner M, Fritzler MJ. Clinical evaluation of autoantibodies to a novel PM/Scl peptide antigen. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(3):R704-13. doi: 10.1186/ar1729. Epub 2005 Apr 1. PMID: 15899056; PMCID: PMC1174964.
- 3: Karsten Conrad, Werner Schössler, Falk Hiepe, Marvin J. Fritzler, Book "Autoantibodies in systemic Autoimmune Diseases", Volume 2, third edition – 2015.

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. Las pruebas cutáneas pueden ayudar en el diagnóstico del síndrome de solapamiento. Los síntomas varían, pero en su mayor parte se trata de afecciones cutáneas. Los signos que deben buscarse son el fenómeno de Raynaud, la artritis, la miositis y la esclerodermia. Los síntomas visuales incluyen decoloración de la piel e hinchazón con dolor.
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.



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



Versión B
Última revisión: 03/2025



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