



REF 10130

Nucleo-h

Manual de Instrucciones

Contenido

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



AIDA GmbH
Dr.-Karl-Aschoff-Straße 9
55543 Bad Kreuznach
Germany
Phone: +49 671 92065090
Fax: +49 671 92065091
Website: www.aida-diagnostics.com
Mail: info@aida-diagnostics.com

	Product Ref.	10130
	Product Desc.	Nucleo-h
	Manual Rev. No.	006: 2024-06-13

1 Utilización

Nucleo-h es un enzimoimmunoensayo en fase sólida con nucleosomas nativos humanos aislados de la línea celular eucariota HeLa para la detección cuantitativa de anticuerpos contra nucleosomas y sus componentes dsDNA e histonas en suero humano.

El ensayo es una herramienta en el diagnóstico diferencial del lupus eritematoso sistémico (LES).

2 Aplicación clínica y principio del ensayo

Los nucleosomas son la estructura básica de la cromatina, importante para la compactación del DNA en el núcleo. Un nucleosoma consta de cuatro histonas H2A, H2B, H3 y H4 que forman un octámero y 146 bp de dsDNA enrollado 1 $\frac{3}{4}$ veces alrededor del núcleo del octámero (H2A, H2B, H3, H4)². La histona H1 interactúa con el nucleosome y juntamente con el DNA unido conecta los nucleosomas vecinos.

Los anticuerpos contra el DNA de doble cadena (dsDNA) y contra las histonas son rasgos comunes del lupus eritematoso sistémico (LES). Burlingame et al. (1993) fue el primero en mostrar en modelos murinos que la producción de anticuerpos anti-cromatina está inducida por una respuesta inmune dependiente de células T con el propio antígeno. Se ha demostrado que la respuesta autoinmune inicial en modelos murinos de LES estaba dirigida contra el nucleosoma. De ahí que los anticuerpos específicos anti-nucleosoma representan un marcador específico y temprano del LES reconociendo epitopos conformacionales compartidos por la molécula de nucleosoma nativa. Más tarde la respuesta autoinmune se puede diversificar hacia los componentes de los nucleosomas, DNA e histonas, como una parte de difusión intermolecular.

Los anticuerpos específicos contra nucleosomas se encuentran con una frecuencia de el 84-88 % en pacientes con LES.

Principio del test

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

	Product Ref.	10130
	Product Desc.	Nucleo-h
	Manual Rev. No.	006: 2024-06-13

3 Contenido del equipo

PARA SER RECONSTITUIDO				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Tampón de muestra (5x)	1 x 20 ml	Blanco	Amarillo	Concentrado 5 x Tris, Cloruro de sodio (NaCl), albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Tampón de lavado (50x)	1 x 20 ml	Blanco	Verde	Concentrado 50 x Tris, Cloruro de sodio (NaCl), Tween 20, azida sódica < 0,1 % (conservante)
LISTO PARA EL USO				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Control negativo	1 x 1,5 ml	Verde	Incoloro	Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Control positivo	1 x 1,5 ml	Rojo	Amarillo	Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Calibradores	6 x 1,5 ml	Blanco	Amarillo *	Concentración de cada calibrador: 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml. Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Conjugado, IgG	1 x 15 ml	Azul	Azul	Contiene: Inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa de rábano picante, albúmina de suero bovino (BSA)
Substrato TMB	1 x 15 ml	Negro	Incoloro	Terametilbenzidina estabilizada y peróxido de hidrógeno (TMB/H ₂ O ₂)
Solución de paro	1 x 15 ml	Blanco	Incoloro	Ácido clorhídrico 1M
Placa Microtiter	12 x 8 tiras de pocillos	N/D	N/D	Con tiras rompibles de pocillos. Consulte el párrafo 1 para obtener información sobre revestimiento.
* La intensidad del color aumenta con la concentración				
MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO				
Filtro de lectura de 450 nm para lector de tiras Microtiter y filtro de referencia recomendado de 620 nm (600-690 nm). Equipo de cristal (cilindro 100-1000 ml), tubos de ensayo para disoluciones. Mezclador espiral, pipetas de precisión (10, 100, 200, 500, 1000 µl) o pipeta múltiple ajustable (100-1000 µl). Dispositivo de lavado de la microplaca (pipeta de repetición o microcanal de 300 µl o sistema automatizado), papel absorbente. Nuestras pruebas se han diseñado para uso con agua destilada, de acuerdo con la definición de las farmacopeas de Estados Unidos (USP 26 - NF 21) y Europa (Eur.Ph. 4ª ed.).				

4 Almacenamiento y Caducidad

Guarde todos los reactivos y la microplaca a 2-8°C/35,6-46,4°F, en sus envases originales. Una vez preparadas, las soluciones reconstituidas son estables durante 1 mes a 2-8°C/35,6-46,4°F, por lo menos. Los reactivos y la microplaca deben ser utilizados solamente dentro del margen de caducidad indicado en cada componente. Evite la exposición de la solución TMB a la luz intensa. Guarde las microplacas en su sobre correspondiente, incluyendo el desecante, y séllelo bien.

	Product Ref.	10130
	Product Desc.	Nucleo-h
	Manual Rev. No.	006: 2024-06-13

5 Precauciones

5.1 Datos de riesgo para la salud

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

Recomendaciones y precauciones

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

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

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

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

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

5.2 Instrucciones generales para la utilización

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

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

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

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

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

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

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

	Product Ref.	10130
	Product Desc.	Nucleo-h
	Manual Rev. No.	006: 2024-06-13

6 Toma, manipulación y almacenamiento de las muestras

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

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

Tras la separación, las muestras de plasma han de utilizarse durante las primeras 8 horas y conservarse herméticamente cerradas a 2-8°C/35,6-46,4°F hasta 48 horas o congeladas a -20°C/-4°F durante periodos más prolongados

7 Procedimiento del ensayo

7.1 Preparativos antes de dispensar

Diluya los reactivos concentrados:

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

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

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

Muestras:

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

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

Lavado:

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

Lavado automático:

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

Lavado manual:

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

Microplacas:

Calcule el número de pocillos necesarios para el ensayo. Saque los pocillos no utilizados del marco, póngalos de nuevo en la bolsa de plástico suministrada junto con el desecante y séllela bien (2-8°C/35,6-46,4°F).

7.2 Esquema de dispensación

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

Para una interpretación cuantitativa

	1	2	3	4...
A	Cal A	Cal E	P1	
B	Cal A	Cal E	P1	
C	Cal B	Cal F	P2	
D	Cal B	Cal F	P2	
E	Cal C	PC	P3	
F	Cal C	PC	P3	
G	Cal D	NC	...	
H	Cal D	NC	...	

CalA: calibrator A

CalD: calibrator D

PC: positive control

P1: patient 1

CalB: calibrator B

CalE: calibrator E

NC: negative control


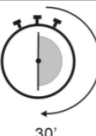
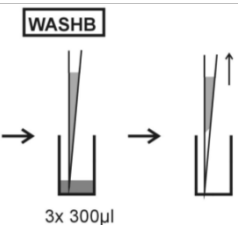
P2: patient 2


CalC: calibrator C



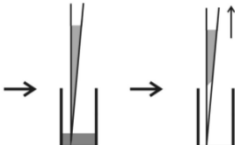
CalF: calibrator F



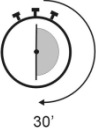
P3: patient 3

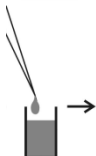


7.3 Esquema de trabajo

Paso	Descripción
1.	Asegúrese de que los preparativos del paso 7.1 (arriba) se han llevado a cabo antes del pipeteado.
2.	Siga los pasos descritos a continuación de acuerdo con los resultados de interpretación cuantitativa que se deseen obtener:
CONTROLES y MUESTRAS	
3.	<div> +100 µl</div> <p>Pipetee en los pocillos designados (tal como se describe en el capítulo 7.2) 100 µl de:</p> <p>Calibradores (CAL.A a CAL.F)</p> <p>y 100 µl de cada uno de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none">Control negativo (CN) y control positivo (CP), ySuero diluido de los pacientes (P1, P2...)
4.	<div> 30'</div> <p>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.</p>
5.	<div> 3x 300µl</div> <p>Lave tres veces con 300 µl de tampón de lavado (diluido al 1:50).</p>

<div> autoimmune diagnostic assays</div>		Product Ref.	10130
		Product Desc.	Nucleo-h
		Manual Rev. No.	006: 2024-06-13

CONJUGADO	
6.	<div><div>CONJ</div><div> +100 µl</div></div> <div>Pipetee 100 µl de conjugado en cada pocillo.</div>
7.	<div><div> 30'</div><div>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.</div></div>
8.	<div><div>WASHB</div><div> 3x 300µl</div></div> <div>Lave tres veces con 300 µl de tampón de lavado (diluido al 1:50).</div>

SUBSTRATO	
9.	<div><div>SUB</div><div> +100 µl</div></div> <div>Pipetee 100 µl de substrato TMB en cada pocillo.</div>
10.	<div><div>  30'</div><div>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F y evite que reciba luz intensa.</div></div>

PARO	
11.	<div><div>STOP</div><div> +100 µl</div></div> <div>Pipetee 100 µl de solución de paro en cada pocillo siguiendo el mismo orden que al pipetear el substrato.</div>
12.	<div><div> 5'</div><div>Incube durante 5 minutos como mínimo.</div></div>
13.	Agite la placa suavemente durante 5 seg.
14.	<div><div> 450/620 nm</div><div>Lea la absorbancia a 450 nm (se recomienda 450/620 nm) durante los 30 minutos siguientes.</div></div>

8 Interpretación Cuantitativa

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

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

Ejemplo de curva standard

NO utilice este ejemplo para interpretar el resultado del paciente

Calibradores IgG	DO 450/620 nm	CV % (Variación)
0 U/ml	0,030	2,8
3 U/ml	0,136	1,0
10 U/ml	0,339	0,5
30 U/ml	0,661	1,4
100 U/ml	1,255	2,9
300 U/ml	2,131	1,8

Ejemplo de cálculo

Paciente	Replicado (DO)	Media (DO)	Resultado (U/ml)
P 01	0,838/0,849	0,844	47,2
P 02	1,503/1,516	1,510	137,3

Las muestras que se encuentren por encima del rango máximo de calibrador se deberán especificar como >Máx. Será necesario diluirlas según se considere apropiado y repetir el ensayo. Las muestras que se encuentren por debajo del rango del calibrador deberán especificarse como < Mín.

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

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

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

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

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

9 Datos Técnicos

Muestra:	suero
Volumen de muestra:	10 µl de muestra diluida a 1:101 con tampón de muestra 1x
Tiempo total de incubación:	90 minutos a temperatura 20-32°C/68-89,6°F
Rango de calibración:	0-300 U/ml
Sensibilidad analítica:	1,0 U/ml
Almacenamiento:	a 2-8°C/35,6-46,4°F utilice solo los viales originales
Número de determinaciones:	96 tests

10 Datos de funcionamiento

10.1 Sensibilidad analítica

La prueba del agente de muestra 30 veces en Nucleo-h produjo una sensibilidad analítica de 1,0 U/ml.

10.2 Especificidad y Sensibilidad

La microplaca está revestida con nucleosomas nativos humanos elevadamente purificados. No se han observado reactividades cruzadas con otros autoantígenos. El test Nucleo-h muestra una especificidad diagnóstica del 90%. La sensibilidad diagnóstica de los anticuerpos específicos del nucleosoma es del 84-88% en pacientes con LES.

10.3 Linealidad

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

Muestra N°	Factor de dilución	concentración medida (U/ml)	concentración esperada (U/ml)	Recuperación (%)
1	1 / 100	152,9	153,6	99,5
	1 / 200	76,4	76,8	99,4
	1 / 400	38,8	38,4	101,0
	1 / 800	17,8	19,2	92,7
2	1 / 100	85,3	84,9	100,5
	1 / 200	44,1	42,5	103,8
	1 / 400	22,0	21,2	103,8
	1 / 800	9,8	10,6	92,5

	Product Ref.	10130
	Product Desc.	Nucleo-h
	Manual Rev. No.	006: 2024-06-13

10.4 Precisión

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

Intra-Ensayo		
Muestra N°	Media (U/ml)	CV (%)
1	174,02	3,7
2	77,98	2,1
3	32,57	2,3

Inter-Ensayo		
Muestra N°	Media (U/ml)	CV (%)
1	111,56	3,6
2	48,06	5,9
3	14,80	4,8

10.5 Calibración






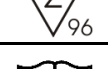

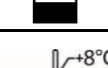











Debido a la no existencia de una calibración de referencia internacional, este ensayo está calibrado en unidades arbitrarias (U/ml).

11 Bibliografía

Burlingame RW, Rubin RL, Balderas RS, Theofilopoulos AN (1993). Genesis and evolution of antichromatin autoantibodies in murine lupus indicates T-dependent immunization with self antigen. J Clin Invest 91: 1687-1696.

Burlingame RW, Boey ML, Starkebaum G, Rubin RL (1994). The central role of chromatin in autoimmune response to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 94: 184-192.

Chabre H, Amoura Z, Piette JC, Godeau P, Bach JF, Koutouzov S (1995). Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 38: 1485-1491.

	- Diagnosi in vitro - Pour diagnostic in vitro - In Vitro Diagnostikum - Para uso Diagnóstico in vitro	- For in vitro diagnostic use - Para uso diagnóstico in vitro - In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	* Numero d'ordine * Référence Catalogue * Bestellnummer * Número de catálogo	* Catalogue number * Numéro de catalogue * Αριθμός παραγγελίας
	* Descrizione lotto * Lot * Chargen Bezeichnung * Lote	* Lot * Lote * Χαρακτηρισμός παρτίδας
	* Identificatore univoco del dispositivo * Identifiant unique de l'appareil * eindeutige Produktidentifizierung * Identificador único do dispositivo	* Unique Device Identifier * Identificador único del dispositivo * Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	* Conformità europea * Déclaration CE de Conformité * Europäische Konformität * Declaração CE de Conformidade	* EC Declaration of Conformity * Declaración CE de Conformidad * Ευρωπαϊκή συμφωνία
	* 96 determinazioni * 96 tests * 96 Bestimmungen * 96 Testes	* 96 tests * 96 pruebas * 96 προσδιορισμοί
	* Rispettare le istruzioni per l'uso * Voir les instructions d'utilisation * Gebrauchsanweisung beachten * Ver as instruções de uso	* See instructions for use * Ver las instrucciones de uso * Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	* Da utilizzarsi entro * Utiliser avant le * Verwendbar bis * Utilizar antes de	* Use by * Utilizar antes de * Χρήση μέχρι
	* Conservare a 2-8°C * Conserver à 2-8°C * Lagerung bei 2-8°C * Conservar entre 2-8°C	* Store at 2-8°C (35.6-46.4°F) * Conservar a 2-8°C * Φυλάσσεται στους 2-8°C
	* Prodotto da * Fabriqué par * Hergestellt von * Fabricado por	* Manufactured by * Fabricado por * Κατασκευάζεται από
	* Controllo positivo * Contrôle Positif * Positiv Kontrolle * Controllo positivo	* Positive Control * Control Positivo * Θετικός ορός ελέγχου
	* Controllo negativo * Contrôle Négatif * Negativ Kontrolle * Controllo negativo	* Negative Control * Control Negativo * Αρνητικός ορός ελέγχου
	* Calibratore * Etalon * Kalibrator * Calibrador	* Calibrator * Calibrador * Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	* Coniugato * Conjugé * Konjugat * Conjugado	* Conjugate * Conjugado * Σύζευγμα
	* Micropiastra rivestita * Microplaque sensibilisée * Beschichtete Mikrotiterplatte * Microplaca revestida	* Coated microtiter plate * Microplaca sensibilizada * Επικαλυμμένη μικροτράκα
	* Tampone di lavaggio * Tampon de Lavage * Waschpuffer * Solução de lavagem	* Wash buffer * Solución de lavado * Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	* Tampone substrato * Substrat * Substratpuffer * Substrato	* Substrate buffer * Tampón sustrato * Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	* Reagente bloccante * Solution d'Arrêt * Stopreagenz * Solução de paragem	* Stop solution * Solución de parada * Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης
	* Tampone campione * Tampon Echantillons * Probenpuffer * Diluente de amostra	* Sample buffer * Tampón Muestras * Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων