

**BIO-RAD**

REF 31020

L50336501ES00

KALLESTAD™**Anti-Histone
Microplate EIA****Manual de instrucciones**

Para la detección semi-cuantitativa o cualitativa de autoanticuerpos contra el antígeno histona en suero o plasma humanos por enzimoimmunoensayo indirecto.

IVD

CE



Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547, USA
UK, Bio-Rad Laboratories Europe Ltd., Perth

CD en varios idiomas

Este kit incluye un CD-ROM en los siguientes idiomas: inglés, alemán, francés, español, italiano, portugués, sueco, danés y griego.

Símbolos de la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro

 <ul style="list-style-type: none"> • European Conformity • EG-Konformität • Conformité européenne • Conforme a la normativa europea • Conformità Europea • Conformidade com as normas europeias • Uppfyllet EU-direktiv • CE-mærkning • Συμμόρφωση με τους Ευρωπαϊκούς κανονισμούς 	 <ul style="list-style-type: none"> • Manufacturer • Hersteller • Fabricant • Fabricante • Produttore • Fabricante • Tillverkare • Producent • Κατασκευαστής 	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Mfd. For</div> <ul style="list-style-type: none"> • Manufactureref for • Hergestellt für • Fabriqué pour • Fabricado para • Prodotto per • Fabricado para • Tillverkas för • Produceret for • Κατασκευάζεται για λογαριασμό της 	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">EC REP</div> <ul style="list-style-type: none"> • Authorized Representative in the European Union • Autorisierter Vertreter in der Europäischen Union • Représentant agréé pour l'Union Européenne • Representante Autorizado en la Unión Europea • Rappresentante autorizzato per l'Unione Europea • Representante Autorizado da União Europeia • Auktoriseret EU-representant • Autoriseret repræsentant i EU • Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Ένωση
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">LOT</div> <ul style="list-style-type: none"> • Lot Number • Chargenbezeichnung • Numéro de lot • Número de lote • Numero di lotto • Número do lote • Batchnummer • Lotnummer • Αριθμός παρτίδας 	 <ul style="list-style-type: none"> • Use by • Haltbar bis • Utiliser avant • Fecha de caducidad • Scadenza • Utilizar até • Användes före • Utløbsdato • Ημερομηνία λήξης 	 <ul style="list-style-type: none"> • Temperature Limit • Temperaturgrenze • Limite de température • Limite de temperatura • Limite di temperatura • Limite de temperatura • Temperaturgrænser • Temperaturmråde • Όριο θερμοκρασίας 	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">IVD</div> <ul style="list-style-type: none"> • For In Vitro Diagnostic Use • In-vitro-Diagnostikum • Utilisation comme test de diagnostic in vitro • Para uso en diagnóstico in vitro • Per uso diagnostico in vitro • Para uso em diagnóstico in vitro • För in vitro-diagnostiskt bruk • Til in vitro-diagnostisk brug • Για in vitro διαγνωστική χρήση
 <ul style="list-style-type: none"> • Consult Instructions for Use • Gebrauchsanleitung beachten • Consulter la notice d'utilisation • Consulte las instrucciones de uso • Fare riferimento alle Istruzioni per l'uso • Consulte as instruções de utilização • Se bruksanvisning före användande • Se brugsvejledningen • Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης 	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">REF</div> <ul style="list-style-type: none"> • Catalog Number • Katalognummer • Référence • Número de catálogo • Numero di catalogo • Número de catálogo • Katalognummer • Katalognummer • Αριθμός καταλόγου 	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CAL 0</div> <ul style="list-style-type: none"> • Calibrator 0 • Kalibrator 0 • Calibrateur 0 • Calibrador 0 • Calibratore 0 • Calibrador 0 • Kalibrator 0 • Kalibratorer 0 • Βαθμονομητής 0 	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CAL 1</div> <ul style="list-style-type: none"> • Calibrator 1 • Kalibrator 1 • Calibrateur 1 • Calibrador 1 • Calibratore 1 • Calibrador 1 • Kalibrator 1 • Kalibratorer 1 • Βαθμονομητής 1

KALLESTAD™ Anti-Histone Microplate EIA

<p>CAL 2</p> <ul style="list-style-type: none"> • Calibrator 2 • Kalibrator 2 • Calibrateur 2 • Calibrador 2 • Calibratore 2 • Calibrador 2 • Kalibrator 2 • Kalibratorer 2 • Βαθμονομητής 2 	<p>CAL 3</p> <ul style="list-style-type: none"> • Calibrator 3 • Kalibrator 3 • Calibrateur 3 • Calibrador 3 • Calibratore 3 • Calibrador 3 • Kalibrator 3 • Kalibratorer 3 • Βαθμονομητής 3 	<p>CAL 4</p> <ul style="list-style-type: none"> • Calibrator 4 • Kalibrator 4 • Calibrateur 4 • Calibrador 4 • Calibratore 4 • Calibrador 4 • Kalibrator 4 • Kalibratorer 4 • Βαθμονομητής 4 	<p>CONJ</p> <ul style="list-style-type: none"> • Conjugate • Konjugat • Conjugué • Conjugado • Coniugato • Conjugado • Konjugat • Konjugat • Συζυγές
<p>CONTROL -</p> <ul style="list-style-type: none"> • Negative Control • Negativkontrolle • Contrôle Négatif • Control negativo • Controllo negativo • Controllo Negativo • Negativ kontroll • Negativ kontrol • Αρνητικός μάρτυρας 	<p>CONTROL +</p> <ul style="list-style-type: none"> • Positive Control • Positivkontrolle • Contrôle Positif • Control positivo • Controllo positivo • Controllo Positivo • Positiv kontroll • Positiv kontrol • Θετικός μάρτυρας 	<p>CONTROL RF</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reference Control • Referenzkontrolle • Sérum de Référence • Control de Référence • Controllo di Riferimento • Controllo de Referência • Referenskontroll • Referencekontrol • Μάρτυρας αναφοράς 	<p>SAMP DIL CONC B</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sample Diluent Concentrate B • Probediluentkonzentrat B • Diluant concentré pour échantillons B • Diluyente de Muestras Concentrado B • Diluente Concentrato per Campioni B • Concentrado B de Diluente para Amostras • Provdiluentkonzentrat B • Prøvefortynderkoncentrat B • Συμπύκνωμα Β αραιωτικού δειγμάτων
<p>MPLT</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplate • Mikrotiterplatte • Microplaque • Microplaca • Micropiastra • Microplaca • Mikroplatta • Mikroplade • Μικροπλάκα 	<p>STOP</p> <ul style="list-style-type: none"> • Stop Solution • Stopplösung • Solution d'arrêt • Solución de parada • Soluzione bloccante • Solução de Paragem • Stopplösning • Stopplösning • Ανασχετικό διάλυμα 	<p>SUBS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Substrate • Substrat • Substrat • Substrato • Substrato • Substrato • Substrat • Substrat • Υπόστρωμα 	<p>WSH BUF CONC</p> <ul style="list-style-type: none"> • Wash Buffer Concentrate • Waschpufferkonzentrat • Solution de lavage concentrée • Tampón de Lavado Concentrado • Tampone di Lavaggio Concentrato • Concentrado de tampão de lavagem • Tvättbuffertkoncentrat • Vaskebufferkoncentrat • Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης

TABLA DE MATERIAS

	Página
Uso al que está destinado	Portada
Resumen y explicación	2
Principios del procedimiento	2
Información del producto	3
Advertencias y precauciones	5
Recolección de muestras y preparación	6
Procedimiento	6
Control de calidad	9
Resultados	10
Limitaciones del procedimiento	12
Valores esperados	12
Características específicas del funcionamiento	14
Resumen del procedimiento	15
Referencias	16

RESUMEN Y EXPLICACION

Los anticuerpos anti-histona están presentes entre un 30-90% de tanto Lupus (SLE) o Lupus inducido por drogas (DIL) (1-6). Los anti-histona son los anticuerpos antinucleares mas importantes encontrados en DIL, mientras que en Lupus idiopatico aparecen muchas otras especificidades por anticuerpos anticucleares (1,12).

Los anticuerpos anti-histona están también presentes en casos de cirrosis biliar primaria y artritis crónica juvenil (JCA) (7,8,11). También se han detectado en artritis reumatoide y otras enfermedades reumáticas así como lepra y gammapatia (9,10,12-14).

Una característica de las enfermedades reumáticas sistémicas es la presencia de anticuerpos circulantes para una variedad de antígenos celulares. La detección de estos autoanticuerpos juega un papel fundamental en el diagnostico diferenciado de enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide (RA), Síndrome Sjörgrens, esclerodermia y polimiositis. Bio-Rad Laboratories dispone también de kits para la detección de anticuerpos de Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Jo-1, Scl-70, dsDNA, cardiolipin, mitochondria, y centromero.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los micropocillos están recubiertos con antígeno de histona altamente purificado. Durante la primera incubación, los autoanticuerpos específicos presentes en el suero o plasma diluido se unen al revestimiento antigénico de los micropocillos. Luego se lavan los micropocillos para eliminar los componentes séricos o plasmáticos no unidos. Un conjugado de anticuerpo monoclonal contra IgG y IgM humana marcado con enzimas se fija a los anticuerpos unidos a la superficie durante la segunda incubación. Después de otro paso de lavado, se identifican los anticuerpos específicos mediante la incubación con el sustrato. La adición de la solución de parada termina la reacción y proporciona el pH adecuado para que se revele el color. Se lee espectrofotométricamente la intensidad de color magenta resultante. La cantidad de conjugado unido se mide en términos de unidades de absorbancia.

En el protocolo semi-cuantitativo, se calcula la concentración de anticuerpo anti-histona de una muestra desconocida haciendo una

interpolación a partir de una curva de respuesta a la dosis que se basa en calibradores.

En el protocolo cualitativo, se compara la cantidad de conjugado que se une en presencia de la muestra desconocida con la que se une en presencia de una concentración conocida de anticuerpo anti-histona en el control de referencia.

INFORMACION DEL PRODUCTO

96 determinaciones

Todos los reactivos, excepto el Tampón Concentrado de Lavado, del Diluyente Concentrado de la Muestra, y Control Negativo y Control Positivo vienen listos para usar. Todos los reactivos son estables hasta de caducidad que se indica en la etiqueta si se almacenan en las condiciones recomendadas (+2-8°C). La turbidez o precipitación de cualquier componente del kit es señal de inestabilidad y no se debe utilizar el componente.

R1: Microplaca: 12 x 8 tiras de micropocillos

Recubiertos con antígeno histona, cerradas herméticamente en un envase de aluminio con desecante. Los pozos individuales pueden separarse de cada banda de microtitulación. Guardar las tiras de micropocillos no usadas en una bolsa sellada con desecante dentro y almacenar a +2-8°C.

R2: Concentrado de Diluyente de Muestras B: [5X], 1 x 25 ml

X_n  Búfer fosfatado, albúmina sérica bovina (BSA) y 0,5% (c/v) azida sódica. Diluir vertiendo el contenido de un vial en un recipiente limpio y añadiendo 100 ml de agua destilada o desionizada. El diluyente de muestras diluido es estable hasta 6 meses a +2-8°C o hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del vial (la que sea inferior), siempre que se evite la contaminación microbiana.

R3: Búfer de Lavado Concentrada: [16X], 2 x 25 ml

X_n  Búfer boratado, Triton X-100 y 0,8% (c/v) azida sódica. Diluir vertiendo el contenido de un vial en un recipiente limpio y añadir 375 ml de agua destilada o desionizada. El tampón de lavado diluido es estable hasta 6 meses a +2-8°C o hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del vial (la que sea inferior), siempre que se evite la contaminación microbiana.

C0: Control Negativo: 1 x 130 µl

Plasma humano con < 0,1% (c/v) azida sódica. Diluir 1 al 100 del mismo modo que las muestras de los pacientes, por ejemplo: 10 µl a 1,0 ml de Diluyente de Muestras diluido.

C1: Control de Referencia: 1 x 1,5 ml

Plasma humano en búfer con < 0,1% (c/v) azida sódica. **LISTO PARA SU USO. NO NECESITA DILUIRSE.**

C2: Control Positivo: 1 x 230 µl

Xn  Plasma humano con 0,1% (c/v) azida sódica. Diluir 1 al 100 del mismo modo que las muestras de los pacientes, por ejemplo: 10 µl hasta 1,0 ml de Diluyente de Muestras diluido.

S0: Calibrador 0: 1 x 1,0 ml

Albumina sérica bovina (BSA) en búfer con 0,1% (c/v) azida sódica, que contiene 0 U/ml. **LISTO PARA SU USO. NO NECESITA DILUIRSE.**

S1-S4: Calibradores 1-4: 1,0 ml de cada uno

Plasma humano en búfer con < 0,1% (c/v) azida sódica, que contiene 2, 8, 30 y 100 U/ml. **LISTO PARA SU USO. NO NECESITA DILUIRSE.**

R4: Conjugado IgG/IgM: 1 x 15 ml

Anticuerpo monoclonal de murina marcado con fosfatasa alcalina a IgG e IgM humana en búfer Tris con albumina sérica bovina (BSA) y < 0,1% (c/v) azida sódica.

R5: Sustrato: 1 x 15 ml

Xi  Ión magnesio 2+ como cofactor enzimático, monofosfato de fenolftaleína (PMP) y Bronidox al 10% en solución búfer. No exponer a la luz durante el almacenamiento. El sustrato debe tener un color amarillo pálido. El color rosa indica contaminación y hay que desechar el reactivo.

R6: Solución de Parada: 1 x 15 ml

Xi  Búfer con 5% de hidróxido de sodio 0,4N, sal de tetrasodio EDTA y carbonato de sodio, pH > 10.

Portatiras de micropocillos: 1**Bolsa sellada con desecante: 1**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para diagnóstico in vitro.
 2. Material biológico de origen humano usados en la preparación de los reactivos han sido testados y encontrados no reactivos a antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (HCV), y anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1 y HIV-2). Considerando que en la actualidad no existen métodos analíticos que garanticen la ausencia absoluta de agentes infecciosos, se recomienda manipular los reactivos así como las muestras de pacientes considerándolos transmisores potenciales de enfermedades infecciosas (15).
 3. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Al desechar los líquidos, añadir agua en abundancia para evitar la acumulación de azida (16).
4. PRODUCTOS PELIGROSOS:

Xn **R2** CONCENTRADO DE
DILUYENTE DE MUESTRAS B
(5X)

Nocivo
Contiene azida sódica
R22-52/53, S36/37/39-46-61

Xn **R3** BÚFER DE LAVADO CON-
CENTRADA (16X)

Nocivo
Contiene azida sódica
R22-52/53, S26-36/37/39-46-61

Xi **R5** SUSTRATO

Irritante
Contiene Bronidox
R36, S25-26-36/37/39

Xi **R6** SOLUCIÓN DE PARADA

Irritante
Contiene carbonato de sodio, sal
tetrasodio EDTA e hidróxido sódico
R36/38, S25-26-36/37/39-45-60

Xn **C2** CONTROL POSITIVO

Nocivo
Contiene azida sódica
R22, S36

R22	Nocivo por ingestión.
R36	Irrita los ojos.
R36/38	Irrita los ojos y la piel.
R52/53	Nocivo para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
S25	Evítese el contacto con los ojos.
S26	En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
S36	Úsese indumentaria protectora adecuada.
S36/37/39	Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.
S45	En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).
S46	En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstresele la etiqueta o el envase.
S60	Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.
S61	Evítese su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad.

RECOLECCION DE MUESTRAS Y PREPARACION

El suero o plasma son las muestras recomendadas. No utilizar muestras lipémicas, hemolizadas o turbias. Las muestras se pueden almacenar a +2-8°C hasta un máximo de 5 días o a -20°C hasta un máximo de 4 semanas. Mezclar bien las muestras descongelaadas antes del ensayo y evitar los procesos de congelación/descongelación. Las muestras no deben ser inactivadas al calor, ya que podrían producirse resultados positivos falsos. Las muestras diluidas al 1 al 100 con Diluyente de Muestras son estables hasta 28 días si se conservan a +2-8°C.

PROCEDIMIENTO

Material suministrado

- R1: Microplaca para
- R2: Concentrado de Diluyente de Muestras B
- R3: Búfer de Lavado Concentrada
- C0: Control Negativo
- C1: Control de Referencia
- C2: Control Positivo

- S0-S4: Calibradores
- R4: Conjugado IgG/IgM
- R5: Sustrato
- R6: Solución de Parada
- Portatiras de micropocillos
- Bolsa sellada con desecante

Material necesario pero no suministrado

1. Lector de placa o tira de 96 pocillos con filtro de 550 nm. Los filtros en el rango 540-565 nm proporcionan resultados aceptables.
 2. Pipetas de precisión capaces de administrar 10 µl, 100 µl y 1,0 ml.
 3. Pipeta automática de 100 µl para adicionar el Conjugado, el Sustrato y la Solución de Parada.
 4. Lavador de placas automático o pipeta automática de 200 µl.
 5. Cronómetro para determinar intervalos de 30 y 60 minutos.
 6. Probetas de plástico o de vidrio de 100 y 400 ml.
 7. Toallas de papel absorbente.
 8. Agua destilada o desionizada.
 9. Recipientes o tubos adecuados (1 ml) para la dilución de las muestras.
- Opcional: Una lectura de longitud de onda dual puede realizarse con un filtro de 550 nm y un filtro de referencia en el rango 620-630 nm.

Comentarios sobre el procedimiento

1. Con el fin de obtener resultados fiables y coherentes, ajustarse estrictamente a las instrucciones de este documento. No modificar las condiciones de almacenaje y de manejo de los reactivos del kit ni de las muestras de los pacientes.
2. No mezclar las tiras recubiertas o los reactivos de diferentes números de lote. No utilizar los reactivos fuera de la fecha de caducidad indicada.
3. Debe evitarse la contaminación de los reactivos. Utilizar una punta de pipeta desechable limpia y nueva para la manipulación de cada reactivo o muestra de paciente.
4. Asegurarse de que todas las tiras se encuentran bien sujetas al portatiras de pocillos. Guardar el portatiras de pocillos para usos posteriores.

5. Las muestras de los pacientes, los Controles y los Calibradores deben adicionarse de forma continua. El tiempo que dure el proceso de adición de principio a fin no debe exceder de 15 minutos. Para obtener resultados óptimos utilizar pipetas de repetición o pipetas multicanal para la adición de los reactivos corrientes.
6. **NO CONGELAR LOS KITS.**

Procedimiento

1. Como mínimo 30 minutos antes de utilizarlos llevar todos los reactivos y los envases de aluminio de las microplacas a temperatura ambiente (+18-25°C). Mezclar los reactivos invirtiéndolos suavemente.
2. Calcular el número de tiras de microtitulación necesarias para el ensayo y colocarlas en la bandeja de tiras de microtitulación. Volver a introducir las tiras sobrantes en el envase de papel aluminio y guardarlo en la bolsa sellable con desecante a +2-8°C hasta que se precisen. Asegurarse de que todas las tiras están bien sujetas en la bandeja de tiras de microtitulación, con las postaña de identificación del ensayo alineada con el borde inferior bajo la fila H. Los usuarios pueden numerar cada tira en el borde superior como identificación adicional. Guardar la bandeja de tiras de microtitulación para usos adicionales.
3. Diluir el Tampón de Lavado Concentrado vertiendo el contenido del vial en un recipiente limpio y añadiendo 375 ml de agua destilada o desionizada. Mezclar muy bien.
4. Diluir el Diluyente de Muestras Concentrado vertiendo el contenido del vial en un recipiente limpio y añadiendo 100 ml de agua destilada o desionizada. Mezclar muy bien.
5. Diluir las muestras de los pacientes y los Controles Positivo y Negativo del 1 al 100, por ejemplo; poner 1,0 ml del Diluyente de Muestras diluido en un recipiente adecuado y añadir 10 µl de muestra. Mezclar muy bien.
6. Numerar los pocillos de las tiras de pocillos para permitir la identificación de las Muestras de los Pacientes y de los Controles o los Calibradores.
7. Pipetear por duplicado en los pocillos correspondientes;
 - a. 100 µl de referencia control para la prueba cualitativa.
 - b. 100 µl de cada calibrador S0-S4 para la prueba semicuantitativa.

KALLESTAD™ Anti-Histone Microplate EIA

8. Pipetear 100 µl de cada muestra de paciente **prediluida** y los controles positivos y negativos en los pocillos restantes.
9. Incubar durante 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente (+18-25°C).
10. Aspirar la placa o invertirla sobre una pila adecuada para la recogida de materiales biológicos. Si se invierte, golpear bruscamente sobre papel absorbente bastantes veces para eliminar el exceso de líquido.
11. Lavar las placas 3 veces con una pipeta automática o un lavador de placas, utilizando un mínimo de 200 µl de Tampón de Lavado diluido por lavado de cada pocillo. Aspirar o decantar el líquido por inversión rápida sobre la pila. Si se invierte, golpear bruscamente sobre papel absorbente varias veces para eliminar el exceso de líquido.
12. Añadir 100 µl de Conjugado a cada pocillo.
13. Incubar durante 30 ± 5 minutos a temperatura ambiente (+18-25°C).
14. Repetir el paso 10.
15. Repetir el paso 11.
16. Añadir 100 µl de Substrato a cada pocillo siguiendo la misma secuencia de pipeteo que se siguió en el paso 12.
17. Incubar durante 30 ± 5 minutos a temperatura ambiente (+18-25°C).
18. Añadir 100 µl de la Solución de Parada a cada pocillo siguiendo la misma secuencia que se siguió en el paso 12. Golpear la placa suavemente para mezclar bien los contenidos de cada pocillo.
19. Leer los pocillos con un lector de placas antes de una hora.

CONTROL DE CALIDAD

Para asegurar la validez de los resultados en cada análisis, cada laboratorio deberá incluir Controles Positivo y Negativo en cada placa.

Cuando los controles no cumplan las especificaciones descritas, el análisis no es válido y los resultados de las muestras de los pacientes no deben ser comunicados. El/la usuario/a puede decidir si repite el análisis, en caso de haber revisado el procedimiento que siguió, o bien puede contactar con el disfabricante. Si se llevara a cabo una repetición del análisis, deberá prepararse una nueva dilución de cada control.

Ensayo Cualitativo

Debe incluirse el Control de Referencia Anti-Histona, que se suministra listo para su utilización, en todos los ensayos. Se recomienda ensayar el Control de Referencia por duplicado.

1. El índice de la media $\frac{\text{Valor de absorbancia del Control Negativo}}{\text{Valor de absorbancia del Control de Referencia}}$ debe ser inferior a 0,95.
2. El índice de la media $\frac{\text{Valor de absorbancia del Control Positivo}}{\text{Valor de absorbancia del Control de Referencia}}$ debe ser el fijado en la etiqueta del Control Positivo.
3. La densidad óptica del control de referencia debe ser 0,1 unidades de absorbancia. Si la densidad óptica del control de referencia es $< 0,1$ unidades de absorbancia, el ensayo no será válido y no se darán por válidos los resultados obtenidos con las muestras de los pacientes.

Ensayo Semi-cuantitativo

Cada ensayo de Anti-Histona de Kallestad™ deberá considerarse por separado al calcular e interpretar los resultados.

1. La concentración del control negativo 5 U/ml.
2. El rango esperado aceptable para el Control Positivo debe estar comprendido entre los valores impresos en la etiqueta del vial.

Conservantes, con azida de sodio al 0,1% (p/v), por lo que no afectará a los resultados de las muestras.

RESULTADOS

Ensayo Cualitativo

Debe calcularse el índice de unidad de absorbancia (densidad óptica) para cada muestra de la siguiente manera

$$\frac{\text{Valor de absorbancia de la muestra}}{\text{Valor de absorbancia del Control de Referencia}}$$

Se recomienda a los usuarios del Anti-Histona de Kallestad™ que determinen un ratio para su población de pacientes que proporcione una discriminación óptima entre las muestras negativas y positivas.

KALLESTAD™ Anti-Histone Microplate EIA

<u>Conciento de absorbancia</u>	<u>Interpretación de los resultados</u>
<0,95	Negativos
0,95 à 1,0	Resultado en los límites. Se recomienda repetir el ensayo. Si el resultado es todavía equivoco después de repetir el ensayo, se deberá obtener una nueva muestra después de un intervalo de tiempo adecuado.
Ind. de absorbancia =	
>1,0	Positivo

Se recomienda volver a analizar los ensayos que den un resultado positivo, utilizando el protocolo cuantitativo.

Ensayo Semi-cuantitativo

Se recomienda que los usuarios de Anti-Histona de Kallestad™ establezcan márgenes normales para la población que acude a sus laboratorios.

Cada ensayo de Anti-Histona de Kallestad™ deberá considerarse por separado al calcular e interpretar los resultados.

Calcule el valor medio de absorbancia de cada calibrador (ver Tabla 1) y trázelo en un gráfico como función de la concentración del calibrador $\log(10)$ en papel milimetrado. De esta manera, es posible leer las concentraciones de las muestras a partir de la curva de los calibradores. La Figura 1 muestra un gráfico típico. La Figura 1 sólo sirve de referencia y no debe utilizarse para interpretar los resultados. Una alternativa consiste en utilizar un programa adecuado de ordenador para diseño de curvas. (Se pueden emplear, por ejemplo, los diseños de curvas logísticas de 4 parámetros o \log/\logit).

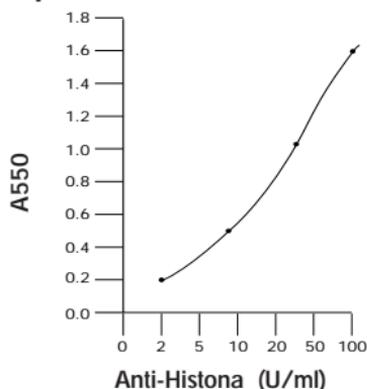
Las muestras con absorbancias superior 100 U/ml están por fuera del alcance de este análisis y deben indicarse como > 100 U/ml. Dichas muestras pueden diluirse según una dilución adicional de 1/10 se recomienda. Al calcular los resultados para cualquier muestra que haya sido diluida adicionalmente, es necesario corregir la concentración obtenida por dicho factor de dilución. (Por ejemplo, si se diluye una muestra 1/10, la concentración obtenida deberá multiplicarse por 10). (Por ejemplo, si se diluye una muestra 1/10, la concentración obtenida deberá multiplicarse por 10).

Es necesario tener en cuenta que en cualquier análisis para medir un anticuerpo lo que se determina no es la concentración de éste, sino su actividad en la muestra. Esta se ve afectada por diversos parámetros como la avidéz del anticuerpo.

Tabla 1: Calibradores del Anti-Histona

Calibradore	U/ml	Calibradore	U/ml
S0	0	S3	30
S1	2	S4	100
S2	8		

Figura 1: Curva Tipica de Calibradores



LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Los valores de concentración obtenidos en este ensayo son solo una ayuda al diagnóstico. Los datos deben ser considerados a la luz de otros resultados clínicos e informes del laboratorio.
2. Cuando se utiliza el análisis Anti-Histona de Kallestad™ para examinar los niveles de anticuerpos, es aconsejable emplear el mismo tipo de muestra a lo largo de todo el período de estudio.

VALORES ESPERADOS

Ensayo Cualitativo

Se recomienda a los usuarios del Anti-Histona de Kallestad™ que determinen un ratio para su población de pacientes que proporcione una discriminación óptima entre las muestras negativas y positivas.

KALLESTAD™ Anti-Histone Microplate EIA

Conciento de absorbancia

<0,95

0,95 à 1,0

>1,0

Interpretación de los resultados

Negativos

Resultado en los límites. Se recomienda repetir el ensayo. Si el resultado es todavía equivoco después de repetir el ensayo, se deberá obtener una nueva muestra después de un intervalo de tiempo adecuado.

Positivo

Se recomienda volver a analizar los ensayos que den un resultado positivo, utilizando el protocolo cuantitativo.

Ensayo Semi-cuantitativo

Se recomienda a los usuarios del Anti-Histona de Kallestad™ establezcan rangos normales para la población que acude a sus laboratorios.

Ciento ochenta y cuatro (184) muestras de suero de individuos asintomáticos sin historia de enfermedades autoinmunes fueron ensayados con el kit de Anti-Histona de Kallestad™. El punto de corte normal se define como el valor de la media más tres desviaciones estándar y se obtuvo un valor de 5 U/ml. Ciento ochenta tres (183) muestras (99%) fueron negativos para los anticuerpos anti-histona utilizando este valor.

Los niveles de Anti-histonas se midieron en un número de grupos de enfermedades. Los datos obtenidos se muestran debajo.

Tabla 2: Valores esperados

Grupos de control y de enfermedades	n	Rango (Units/ml)				% Pos.
		0-5,0	5,1-25	25,1-100	> 100	
Normals	184	183	1	—	—	0,55
SLE	204	98	75	20	11	52
Cirrosis Biliar Primaria	52	39	11	2	—	25
Artritis Reumatoide	50	45	5	—	—	10

CARACTERISICAS ESPECIFICAS DEL FUNCIONAMIENTO

Recuperación

Se analizaron cuatro diluciones de dos positivas muestras en dos análisis separados de Anti-Histona de Kallestad™ utilizando 2 lotes diferentes. La Tabla 3 muestra los valores promedio obtenidos así como el porcentaje de recuperación.

Tabla 3: Características de dilución

Muestra	Dilución	Valor promedio (U/ml)	Recuperación (%)
1	A	20,44	100
	A/2	10,11	98,9
	A/4	5,08	99,4
	A/8	2,87	112
2	A	29,61	100
	A/2	13,26	89,6
	A/4	6,54	88,3
	A/8	3,57	96,5

Precisión

La imprecisión Intra-ensayo se determinó probando 3 controles diferentes en replicas de 8, en 4 ensayos separados, utilizando dos lotes distintos del kit y realizados por dos técnicos.

Tabla 4: Intra-ensayo Precisión

Control	Valor promedio (U/ml)	SD	% CV
1	2,46	0,202	8,21
2	7,09	0,581	8,19
3	18,7	1,87	10,0

Se determinó la precisión entre pruebas analizando 3 controles diferentes en un total de 20 análisis. Los resultados fueron obtenidos por tres técnicos diferentes con tres lotes diferentes de análisis de Anti-Histone de Kallestad™.

Tabla 5: Inter-ensayo Precisión

Control	Valor promedio (U/ml)	SD	% CV
1	2,74	0,266	9,7
2	7,78	0,521	6,69
3	19,8	1,76	8,88

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

1. Añadir 100 µl Calibradore y/o Control de Reference por duplicado. Añadir 100 µl de la muestra diluida, Controles Positivos y Negativos a los pocillos numerados de la tiras de pocillos.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 60 ± 5 minutos.
3. Decantar el contenido.
4. Lavar las tiras de pocillos 3 veces.
5. Añadir 100 µl de Conjugado a cada pocillo.
6. Incubar a temperatura ambiente durante 30 ± 5 minutos.
7. Decantar el contenido.
8. Lavar las tiras de pocillos 3 veces.
9. Añadir 100 µl de Solución Substrato a cada pocillo.
10. Incubar las tiras a temperatura ambiente durante 30 ± 5 minutos.
11. Añadir 100 µl de Solución de Parada a cada pocillo.
12. Leer la absorbancia a 550 nm.

REFERENCIAS

1. Fritzler, M.J. and Tan, E.M. 1978. Antibodies to histones in drug-induced and idiopathic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 62: 560-567.
2. Gohill, J., et al. 1985. Antibodies from patients with drug-induced and idiopathic lupus erythematosus react with epitopes restricted to the amino and carboxyl termini of histone. *J. Immunol.* 135: 3116-3121.
3. Portanova, J.P., et al. 1982. Reactivity of anti-histone antibodies induced by procainamide and hydralazine. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 25: 67-79.
4. Rubin, R.L., et al. 1982. Specificity of anti-histone antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25: 779-782.
5. Thomas, J.O., et al. 1984. The major core histone antigenic determinants in systemic lupus erythematosus are in the trypsin sensitive regions. *Febs. Lett.* 169: 90-96.
6. Muller, S., et al. 1989. Reactivity of autoantibodies in systemic lupus erythematosus with synthetic core histone peptides. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 89: 288-296.
7. Penner, E., et al. 1987. High prevalence of antibodies to histones among patients with primary biliary cirrhosis. *Clin. Exp. Immunol.* 70: 47-52.
8. Ostensen, M., et al. 1989. Identification of antihistone antibodies in subsets of juvenile chronic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 48: 114-117.
9. Bernstein, R.M., et al. 1985. Patterns of α -histone antibody specificity in systemic rheumatic disease SLE, MCTD, primary sicca syndrome and anti-rheumatoid arthritis with vasculitis. *Arthritis Rheum.* 28: 285-293.
10. Muzellec, Y., et al. 1988. Antibodies to histones in rheumatoid arthritis. *Diagnos. Clin. Immunol.* 5: 326-331.

KALLESTAD™ Anti-Histone Microplate EIA

11. Konikoff, F., *et al.* 1989. Antibodies to histones and their subfractions in chronic liver diseases. *Clin. Immunol. Immunopath.* 51: 77-82.
12. Rubin, R.L., *et al.* 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay for anti-DNA and anti-histone antibodies In *Manual of Clinical Laboratory Immunology, Third Edition: 744-749.* Edited by Rose, N.R., *et al.*
13. Shoenfeld, Y., *et al.* 1987. Detection of anti-histone activity in sera of patients with monoclonal gammopathies. *Clin. Immunol. Immunopath.* 42: 250-258.
14. Fellows, G., *et al.* 1988. Individual variation in the isotope profile of anti-histone autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 72: 440-445.
15. HHS Publication No. 93-8395, 3rd ed. May 1993. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.* Washington, DC: US Department of Health and Human Services.
16. *Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts.* April 30, 1976. Atlanta, GA: Centers for Disease Control.
17. Data on file and available on request.

**Clinical
Diagnostics
Group**

4000 Alfred Nobel Drive
Hercules, California 94547
Telephone (510) 724-7000
FAX (510) 741-5824
www.bio-rad.com

AUSTRALIA	Bio-Rad Laboratories Pty. Ltd., Unit 1 Block Y, 391 Park Road, Regents Park NSW 2143 Phone 61-2-9914-2000 • Telefax 61-2-9914-2088
AUSTRIA	Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H., Hummelgasse 68/3-6, A-1130 Vienna Phone 43-1-877-8901 • Telefax 43-1-876-8829
BELGIUM	Dir-Rad S.A., N.V. Dagoniastraat 5, D-9810 IJazareth Eke Phone 32-9-385-5511 • Telefax 32-9-385-6554
BRAZIL	Bio-Rad do Brasil, Rua dos Invalidos 212, 5 Andar, Lapa CEP 20231-020, Rio de Janeiro Phone 5521-3461-5202 • Telefax 5521-2224-6524
CANADA	Bio-Rad Laboratories Ltd., 2403 Goulette Montreal, Québec H4R2E9 Phone 1-514-334-4377 • Telefax 1-514-334-4415
CZECH REPUBLIC	Bio-Rad spol. s.r.o., Nad ostrovom 1119/7, 147 00 Prague 4 Phone 420-2-41430532 • Telefax 420-2-41431042
CHINA	Rio-Rad China Limited, 18F ID Hai Li Building, No. 88 Da Pu Road, Shanghai 200023 Phone 86-21-63052255 • Telefax 86-21-53964775
DENMARK	Bio-Rad Laboratories, Generøvej 8 C, 2730 Herlev Phone 45-4452-1000 • Telefax 45-4452-1001
FINLAND	Bio-Rad Laboratories, Pihlatorntie 1 A, FIN-02240 Espoo Phone 358-9-804-22-00 • Telefax 358-9-804-11-10
FRANCE	Bio-Rad S.A., 3 Boulevard Raymond Poincaré 92430 Marnes-la-Coquette Phone 33-1-4793-6000 • Telefax 33-1-4741-9133
GERMANY	Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidermaierstrasse 164, D-80339 Munich Phone 49-89-3118040 • Telefax 49-89-3118-0100
HONG KONG	Bio-Rad Pacific Ltd., Unit 1101, 11/F, DCK Commercial Centre, 25 Westlands Road, Quarry Bay • Phone 852-2/89-3300 • Telefax 852-2/89-1207
INDIA	Dir-Rad Laboratories (India) Pte. Ltd., D&D, Enkay Towers, Vaniya Nikunj, Udhay Vihar, Phase-V, Gurgaon, 122016 Haryana • Phone 91-124-6398112 • Telefax 91-124-6398115
ISRAEL	Bio-Rad Laboratories Ltd., 14 Horna Street, New Industrial Area, Fishon Le Zon 7650b Phone 072-3 0514127 • Telefax 072-3 0514120
ITALY	Bio-Rad Laboratories S.r.l., Via Cellini 18/A, 20090 Segrate, Milan Phone 39-02-216091 • Telefax 39-02-21609-398
JAPAN	Nippon Bio-Rad Laboratories, 7-18, Higashi-Nipponi 5-chome, Arakawa-ku, Tokyo 116-0014 Phone 81-3-5611-0290 • Telefax 81-3-5611-0282
KOREA	Bio-Rad Korea Ltd., R1, Cambridge Building, 1461-15, Seocho-Dong, Seocho-Gu, Seoul, 137-070 • Phone 82-2-3473-4660 • Telefax 82-2-3472-7003
LATIN AMERICA	Bio-Rad Latin America, 14100 Palmetto Frontage Road, Suite 101, Miami Lakes, Florida 33018 Phone 305-894-5950 • Telefax 305-894-5980
MEXICO	Bio-Rad Laboratorios Mexico, S.A. de C.V., Adolfo Prieto No 1653, Colonia Del Valle, 03100 Mexico, D.F. • Phone 5255-5334-2552 • Telefax 5255-5324-5355
THE NETHERLANDS	Bio-Rad Laboratories B.V., Folkersstraat 10, 3005 KV Vlaanderen Phone 31-318-540666 • Telefax 31-318-542216
NEW ZEALAND	Bio-Rad New Zealand, 189 Bush Road, Albany, Auckland Phone 64-9-415-2200 • Telefax 64-9-415-2204
NORWAY	Bio-Rad Laboratories, Johan Scharffenbergs vei 91, N-0694, Oslo Phone 47-23-36-41-30 • Telefax 47-23-36-41-39
POLAND	Dir-Rad Laboratories, Nakielska Str. 3, 01106 Warsaw Phone 48-22-331-99-99 • Telefax 48-22-331-99-98
PORTUGAL	Bio-Rad Laboratories, Rua do Empreesto Industrial, 3-1º Esq., 2724 - 513, Amadora Phone 351 21-472-7700 • Telefax 351 21-472-7777
RUSSIA	Bio-Rad Laboratories Ltd., 37/A14 Leningradskiy Tr., 125167 Moscow Phone 7-095-721-14-00 • Telefax 7-095-721-14-12
SINGAPORE	Bio-Rad Laboratories (Singapore) Pte. Ltd., 27 International Business Park, 101-02, 009624 • Phone 65-6415-3188 • Telefax 65-6415-3189
SOUTH AFRICA	Bio-Rad Laboratories (Pty) Ltd., 34 Rolton Road, Parkwood, Johannesburg 2193 Phone 27-11-442-85-08 • Telefax 27-11-442-85-25
SPAIN	Bio-Rad Laboratories S.A., Miniparc II, Edificio M. C/ Calendula 95, El Soto de la Moraleja, 28109 Madrid • Phone 34-91-590-5200 • Telefax 34-91-590-5211
SWEDEN	Bio-Rad Laboratorios A.B., Vintergatan 1, Box 1097, S-172 22, Sundbyberg Phone 46-8-555-127-00 • Telefax 46-8-555-127-80
SWITZERLAND	Bio-Rad Laboratories, Nonnenweg 2, CH-4153 Reinach BL Phone 41-61-717-95-55 • Telefax 41-61-717-95-50
THAILAND	Bio-Rad Laboratories Ltd., 1st & 2nd Floor, Lumpini Building, 239/2 Rajdamri Rd., Lumpini, Pathumwan, Bangkok 10330 • Phone 662-651-8311 • Telefax 662-651-8312
UNITED KINGDOM	Bio-Rad Laboratories Ltd., Bio-Rad House, Maylands Ave., Hemel Hempstead, Herts HP2 7TD Phone 44-208-328-2000 • Telefax 44-208-328-2000

Effective Date: Novembre 2004

August 2004