

Inmunoensayo de la Enzima para la Determinación Cualitativa de Anticuerpos IgG contra el Antígeno Nuclear Extraíble (Jo-1) en suero humano

Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo en laboratorio clínico o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Inmunoensayo de la Enzima de Jo-1

USO DESTINADO

Para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG contra el antígeno nuclear extraíble (Jo-1) en suero humano.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad reumática sistémica se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos circulantes que son altamente reactivos con antígenos nucleares y citoplasmáticos. Los anticuerpos Anti-Jo-1, son autoanticuerpo dirigidos a la enzima celular histidil tRNA sintetasa, la cual está presente hasta en un 35% de pacientes con polimiositis (PM) y menos frecuente en pacientes con dermatomiositis (DM). Los anticuerpos Anti-Jo-1 son poco comunes en otras enfermedades reumáticas.

Los anticuerpos Anti-Jo-1, parecen ser no sólo un marcador para PM ya que también definen un subgrupo de pacientes con miositis con un incremento en frecuencia de enfermedad pulmonar intersticial.

Hasta hace poco, los laboratorios han detectado anticuerpos contra Jo-1 por inmunodifusión (ID) y por inmunoelectroforesis. Sin embargo, ambos métodos son consumidores de tiempo para llevarse a cabo y son insensibles relativamente a nuevos métodos. El Inmunoensayo enzimático (EIA) tiene ventajas sobre los otros métodos en sensibilidad, especificidad, facilidad de automatización y tiempo de entrega de pruebas.

El Equipo de Prueba anti-Jo-1 es un procedimiento EIA destinado a la semi-cuantificación de anticuerpos contra el antígeno Jo-1. Los resultados se presentan en unidades ELISA (UE) por ml. determinado por comparación con un calibrador.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Antígenos purificados Jo-1 de bazo de bovino y de timo se une a los micropozos El suero del paciente diluido, calibrador y los controles se colocan en los pozos y se incuban. Los anticuerpos anti-Jo-1, si está presentes, se unirán al antígeno en los micropozos. Después se realiza un lavado de los pozos para eliminar los anticuerpos no unidos, una segunda incubación con conjugado anti- humano IgG con fosfatasa alcalina se lleva a cabo. El conjugado es unido a los anticuerpos anti-Jo-1, si está presente, forma un inmunocomplejo. Los micropozos se lavan de nuevo para eliminar los componentes no unidos y entonces es añadido el sustrato de la enzima p-nitrofenil fosfato. La enzima, si se une, cataliza la hidrólisis del sustrato de p-nitrofenol y el resultado es una formación de color amarillo. La reacción es entonces detenida y el color se lee con un fotómetro a 405 nm (600-630 nm de referencia). La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de anticuerpos anti- Jo-1 IgG presentes en la muestra.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba:

1. Tiras de micropozos cubiertos con antígeno Jo-1 (12 x 8)
2. Diluyente de muestra. 1 Frasco
3. Conjugado de la Enzima. 1 Frasco
4. p-nitrofenil fosfato. sustrato. 1 Frasco**
5. Calibrador. 1 vial
6. Control Positivo. 1 vial
7. Control Negativo. 1 vial
8. Solución de paro. 1 Frasco
9. Concentrado de buffer de lavado 20x. 2 Frascos

****La solución del sustrato puede desarrollar un color amarillo pálido en el almacenaje.**

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada o desionizada
4. Mezclador Vórtex o equivalente.
5. Papel absorbente o toalla de papel
6. Papel cuadriculado
7. Un lector de MicroElisa.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

1. Manejar las muestras, calibradores, controles y materiales, como de riesgo biológico potencial. Cada unidad de los donantes en el calibrador y controles ha dado resultado negativo para el antígeno de superficie de la hepatitis B y anticuerpos contra el HIV-1 aprobado por la FDA de pruebas de tercera generación. Sin embargo, debido a que ningún método puede garantizar la completa seguridad de que el HIV-1, virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos están ausentes, estos materiales deben ser manejados por Bioseguridad nivel 2 para cualquier suero potencialmente infecciosos, muestra de sangre o suero, como es recomendado en el Centers for Disease Control/ National Institutes of Health manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1988.
2. Nunca pipeteé por la boca.
3. Evite contacto con heridas abiertas.
4. Algunos de los reactivos contienen Proclin® 300 como conservante. Al eliminar los reactivos que contienen Proclin® 300, drene los desagües con abundante agua para diluir los componentes activos por debajo de los niveles activos.
5. Los reactivos que contienen azida de sodio:

a) PRECAUCION: Algunos reactivos de este equipo contienen azida de sodio como conservador. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo o el cobre de azidas metálicas altamente explosivas de las tuberías de los drenajes. Para desecharlo, enjuague con un gran volumen de agua para evitar la acumulación, para mas información consulte refiérase a "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts", in the Manual Guide - Safety Management No. CDC- 22, issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

Frases de riesgo de Sustancias Peligrosas en las Comunidades Europeas (Directiva del Consejo 1999/45/EC)

- R28 Muy tóxico por ingestión.
- R32 El contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.
- R50/53 - Muy tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
- 51/2 - Mantenga bajo llave y fuera del alcance de los niños.
- S28 - En caso de contacto con la piel, lavar inmediatamente con abundante agua y jabón.
- S45 - En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico (mostrar la etiqueta si es posible).
- S60 - Este material y / o su recipiente debe ser desechado como residuos peligrosos.
- S61 - Evítese su liberación al medio ambiente. Consulte las instrucciones especiales / Hojas de Datos de Seguridad.

b) La azida de sodio inhibe la actividad de la peroxidasa de rábano picante. Se debe tener cuidado para asegurar que la azida es llevada a más de otros reactivos en los pasos del conjugado y sustrato.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

La sangre entera debe ser obtenida por las técnicas médicas aceptadas. El suero se separa del coágulo y se almacena a una temperatura entre 2-8°C para corto plazo (hasta 7 días), o congelarse a -20° C para el almacenamiento a largo plazo. Evitar múltiples ciclos de congelación-descongelación. Antes de la prueba, llevar los sueros congelados a temperatura ambiente lentamente y mezclar suavemente, evitando la formación de espuma. Las muestras que contengan partículas visibles deberán ser aclaradas por centrifugación antes de la prueba. Muestras muy contaminadas, hemolizadas, lipémicas, o ictericas no deben utilizarse.

PRECAUCIÓN: Las muestras de suero no deben ser inactivadas por calor antes de su uso.

ALMACENAMIENTO DEL EQUIPO DE PRUEBA E INSTRUMENTACIÓN

1. No mezcle ni intercambie los pozos, controles, calibradores o de diferentes lotes.
2. No utilice los reactivos más allá de su fecha de caducidad. Las fechas de vencimiento están impresas en las etiquetas de los reactivos.
3. Incubaciones por encima o por debajo de las temperaturas recomendadas a veces puede dar lugar a resultados erróneos.
4. El método de EIA es una técnica muy sensible. Mantener constante la técnica de pipeteo, tiempos de incubación, y las condiciones de temperatura durante todo el procedimiento de la prueba. La contaminación cruzada entre los reactivos pueden invalidar la prueba.
5. Los micropozos revestidos de antígeno deben de almacenarse con el desecante en la bolsa con sello previsto y regresar a refrigeración inmediatamente después de su uso.
6. (Manual de Procedimiento Únicamente) El procedimiento de lavado es muy importante y requiere una atención especial. (Por favor referirse a la sección de Procedimiento).

NOTA: Los pozos con lavado inadecuado pueden producir resultados erróneos.

PREPARACIÓN DE REACTIVO

1. Traiga todas las muestras y reactivos del equipo de prueba a temperatura ambiente (18 a 26°C) y mezcle cuidadosamente.
2. Prepare 1x de buffer de lavado. Prepare el buffer de lavado al añadir el contenido de la botella (50ml 20x) a un litro de agua destilada o desionizada. Almacene a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Prepare diluciones 1:101 del calibrador, controles y muestras de los

pacientes en el diluyente de la muestra. (por ejemplo, mediante la adición de 2 µL de muestra a 200 µL de diluyente de la muestra o 5 µL de muestra a 500 µL de diluyente de la muestra).

2. Mezclar las diluciones de muestras suavemente al retirar y expulsar con una punta de pipeta 2 o 3 veces, o por un mezclador vortex durante 2 o 3 segundos. Transfiera 100 µL de calibrador diluido, control o muestra del paciente, a los pozos de antígeno. Evitar la formación de burbujas cuando se transfieren las muestras diluidas.

NOTA: Incluya un pozo que contenga 100 µL de diluyente de la muestra sólo en el pozo para el blanco de reactivo. De esta manera podrán ser utilizados para "cero" el fotómetro antes de leer los resultados de la prueba.

3. Permita a los pozos incubar a temperatura ambiente (18-30° C) durante 30 ± 5 minutos.
4. Aspirar o descartar el contenido de los pozos. Elimine cualquier exceso de humedad en los pozos usando una toalla de papel si es necesario. Lavar los pozos de lavado 3 veces con un mínimo de 300 µL por pozo de solución de lavado. Retire el exceso de humedad de los pozos después del lavado. Cuando se utiliza una lavadora automática, siga las instrucciones del fabricante.
5. Colocar 100 µL de Conjugado en cada pocillo, evitar la formación de burbujas.
6. Incube a temperatura ambiente durante 30 ± 5 minutos.
7. Lavar los pocillos como se describe en el paso 4.
8. Ponga 100µL de Sustrato en cada pozo, evitando la formación de burbujas.
9. Permita que los pozos para incubación descubrirlos a temperatura ambiente (18 a 30° C) durante 30 ± 5 minutos.
10. Ponga 100µL de Solución de Paro en cada pozo, evitando la formación de burbujas.
11. Lea la absorbancia de cada pozo a 405 nm contra el cero del reactivo blanco. Con una referencia adecuada de una longitud de onda (Ejemplo., de 600-630 nm. La placa deberá leerse dentro de los 60 minutos de la adición de la Solución de Paro.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Determinar la UE/mL (unidades ELISA/mL) para cada muestra de paciente o control utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{UE/mL del Calibrador}}{\text{Absorbancia del Calibrador}} \times \text{Absorbancia de la muestra} = \text{UE/mL de la muestra}$$

Calibración de un solo punto: El equipo de Prueba Jo-1 ha sido desarrollado usando un calibrador de un solo punto. Los valores de aquellos pacientes, que contengan niveles muy altos de anticuerpos pueden producir valores de absorbancia superiores a la absorbancia del calibrador. Los resultados de muestra de pacientes mayores que el valor del Calibrador deberán ser reportados como "Mayor que el valor del calibrador de la UE/mL". Si los resultados numéricos son necesarios para estas muestras, diluir la muestra con el diluyente de muestra y re-ensayar. Es necesario entonces realizar varias diluciones (por ejemplo 1/10, 1/50 y 1/100). De la muestra pre-diluida puede ser re-analizada simultáneamente Seleccione la dilución que presente una lectura de absorbancia alrededor del 50% de la lectura de absorbancia del calibrador, calculando la UE/mL de esta dilución y multiplicar por el factor de dilución para obtener los valores estimados.

CONTROL DE CALIDAD

1. El Control Positivo deberá estar dentro de este rango asignado.
2. El Control Negativo deberá ser <16 EU/ml.
3. La absorbancia del blanco de reactivo debe ser <0.30.

Si cualquiera de estos criterios no se cumple, la corrida no es válida y debe repetirse.

INTERPRETACIÓN

La siguiente es entendido que pretende ser una guía para la interpretación de los resultados de la prueba de anticuerpos SCL-70. Cada laboratorio debe establecer sus propios criterios de interpretación de la prueba sobre la base de las muestras poblacionales encontradas.

Valores Anti-Jo-1	Valor del Índice *	Interpretación
<16 UE/mL	<0.8	Negativo para anticuerpos anti-Jo-1
16-20 UE/mL	0.8-1.0	Indeterminado contra anticuerpos anti-Jo-1. La muestra debe ser probada de nuevo. Si los resultados son indeterminados re-analizar, la muestra debe ser reportada como indeterminada, probarlas por otro método, o a una nueva muestra debe hacerse la prueba. **
>20 UE/mL	>1.0	Positivo para anticuerpos anti-Jo-1

* El índice del valor se calcula dividiendo la UE/mL de la muestra por 20.

** Las muestras indeterminadas que dan resultados positivos al ensayo repetido deberán ser reportados como positivos. Muestras equívocas que dan resultados negativos a la prueba nuevamente debe ser reportada como negativos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El análisis de una sola muestra de suero no debe utilizarse como único criterio para diagnóstico de una enfermedad autoinmune.
2. Los resultados obtenidos con el equipo de prueba Jo-1 sirve sólo como una ayuda para el diagnóstico y no debe interpretarse como un diagnóstico en sí mismo.
3. La prueba debe realizarse en el suero. El uso de sangre total o plasma no ha sido establecida.

VALORES ESPERADOS

Los anticuerpos contra Jo-1 están presentes en hasta el 35% de los pacientes con polimiositis (PM) y son mucho menos comunes en pacientes con dermatomiositis (DM). Los anticuerpos anti-Jo-1 son poco comunes en otras enfermedades reumáticas. 1.2.3

Los valores esperados en la población normal se determinaron mediante el análisis de 100 sueros de donantes normales recogidos en el sur de Florida.

REACTIVIDAD CRUZADA

Veinte y cuatro sueros positivos para las seis especificidades autoinmunes fueron probados con el Equipo de Prueba Is-anti-Jo-1. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	Jo-1 UE/mL	Interp	Especificidad	Muestra	Jo-1 UE/mL	Interp	Especificidad
1	4.2	NEG	SSA	13	3.1	NEG	RNP
2	3.8	NEG	SSA	14	3.5	NEG	RNP
3	0.8	NEG	SSA	15	5.6	NEG	RNP
4	1.8	NEG	SSA	16	3.3	NEG	RNP
5	4.8	NEG	SSB	17	218.0	POS	Jo-1
6	2.6	NEG	SSB	18	225.5	POS	Jo-1
7	2.7	NEG	SSB	19	199.2	POS	Jo-1
8	2.0	NEG	SSB	20	225.0	POS	Jo-1
9	3.4	NEG	Sm	21	2.2	NEG	Scl-70
10	2.5	NEG	Sm	22	3.8	NEG	Scl-70
11	2.0	NEG	Sm	23	1.3	NEG	Scl-70
12	2.5	NEG	Sm	24	1.5	NEG	Scl-70

REFERENCIAS

1. Bernstein, R. M, Morgan, S. H., Chapman, J., Bunn, C. C., Mathews. M.B., et al. 1984. Anti-Jo-1 antibody: a marker for myositis with interstitial lung disease. *Brit. Med. J.* 289: 151-152.
 2. Yoshida, S., Akizuki, M., Mimori, T., Yamagata, H., et al. 1983. The Precipitating Antibody to an Acidic Nuclear Protein Antigen. the Jo-1, in connective Tissue Diseases. *Arthritis Rheum.* 26 NO.5: 604-611.
 3. Craft, J. and Hardin, J. A. 1993. Antinuclear Antibodies. In: *Textbook of Rheumatology, Fourth Edition.* W. B. Saunders Co., Philadelphia. p.164- 187.
 4. Wasicek, C. A, Reichlin, M. A, Montes, M. and Raghu, G. 1984. Polymyositis and Interstitial Lung Disease in a Patient with Anti-Jo-1 Prototype. *Am. J. Med.* 76: 538-544.
 5. Hochberg, M. C., Feldman, D. Stevens, M. B., Arnett, F. e. and Reichlin, M. A. 1984. Antibody to Jo-1 in Polymyositis/Dermatomyositis: Association with Interstitial Pulmonary Disease. *J. Rheum.* 11: 663-665.
 6. Engvall, E. and Perlmann. P. 1972. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 111. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen Coated Tubes, *J. Immunol.* 109:129-135.
 7. *Manual Guide - Safety Management No. CDC-22, "Decontamination 01 Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts", Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, April 30, 1976.*
- Proclin® 300 is a registered trademark of Rohm and Haas Corp. Philadelphia, PA*

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:

INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS
1155 CHESS DRIVE No. 121
FOSTER CITY, CA 94404 USA