



Anti-Jo-1 Antibody ELISA

IVD

PRODUCT INSERT

REF 1151 Anti-rJo-1 Antibody ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and semi-quantitation of antibodies to Jo-1 in human serum.

SUMMARY AND EXPLANATION

Polymyositis and *dermatomyositis* encompass a heterogeneous group of acquired muscle diseases called *idiopathic inflammatory myopathies*. They are characterized by proximal and often symmetrical muscle weakness that develop relatively slowly. Patients with *idiopathic inflammatory myopathies* may present with nonspecific symptoms such as fatigue, arthralgia, and myalgia, which can mimic other disorders and result in significant delays in a correct diagnosis and initiation of treatment. Autoantibodies are seen in 60-90% of patients with *idiopathic inflammatory myopathies* and their detection is helpful in distinguishing these myopathies from other forms of muscle disease.

Two major groups of autoantibodies can be detected in myositis: myositis specific antibodies, and antibodies that are not specific but associated¹⁻⁵.

Myositis specific antibodies are present in 25-40% of adult patients with *idiopathic inflammatory myopathies*. Certain antibody concentrations, including those to t-RNP synthetases, correlate with disease activity and exhibit cytoplasmic reaction on HEp-2 cells and various tissue substrates. Anti-histidyl-tRNA synthetase (Jo-1) antibodies are the most common. Patients with myositis and positive for Jo-1 antibodies exhibit similar clinical features, especially interstitial lung disease, pulmonary fibrosis, Raynaud's phenomenon, fever and non-erosive symmetric small joint arthritis.

Myositis associated antibodies including U1-RNP, PM/ScI, Ku and SS-A(Ro) antibodies occur not only in myositis but in other connective tissue disorders as well. These autoantibodies can be detected by various methods, such as gel-diffusion, Western Blot or ELISA.

PRINCIPLES OF PROCEDURES

The test is performed as a solid phase enzyme-labeled immunosorbent assay (ELISA). Microwells are coated with purified Jo-1 antigen. Controls, calibrators and patient serum samples are incubated in the antigen coated wells which allows specific anti-Jo-1 antibodies present in the serum to bind. Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgG conjugate to the wells. Unbound conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of pNPP substrate to a colored reaction product.

The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in ELISA Units per milliliter (EU/ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell are for one time use only.

Precautions

For in vitro Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹³.

WARNING - Sodium azide (NaN_3) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Follow good laboratory practises to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use beyond expiration date on the label.

Materials provided









ImmLISA™ Anti-rJo-1Antibody ELISA **REF** 1151

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	MICROPLATE rJo-1	Microplate with individual breakaway microwells coated with Jo-1 antigen
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A Jo-1 *	Ready to use Calibrator A (<i>green cap</i>). Human serum containing Jo-1 antibodies.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B Jo-1 *	Ready to use Calibrator B (<i>violet cap</i>). Human serum containing Jo-1 antibodies.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C Jo-1 *	Ready to use Calibrator C (<i>blue cap</i>). Human serum containing Jo-1 antibodies.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D Jo-1 *	Ready to use Calibrator D (<i>yellow cap</i>). Human serum containing Jo-1 antibodies.
1 x 1.5 ml	CONTROL + Jo-1 *	Ready to use Positive Control (<i>red cap</i>). Contains human serum positive for Jo-1 antibodies.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use Negative Control (<i>whitecap</i>). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL *	Ready to use Serum Diluent . Color coded blue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light.
1 x 12 ml	STOP	Ready to use Stop Solution .
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.

* Contains <0.1% NaN_3

Symbols used on labels:

-  Lot number
-  Catalog number
-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions for use
-  In vitro diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer or automatic microplate washer capable of dispensing 200µl
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

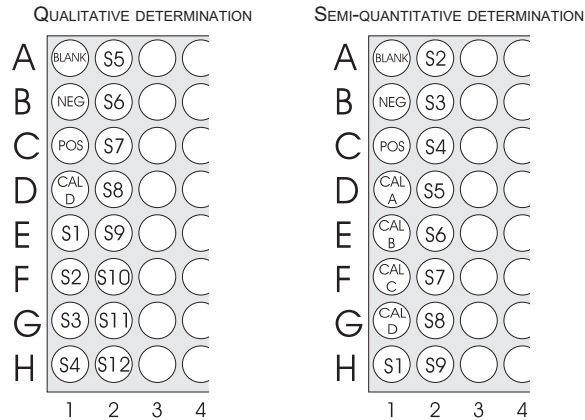
Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE**Procedural Notes**

- Before starting with the assay read carefully the product insert.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate at room temperature before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Good washing technique is critical. If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. An automated microplate washer is recommended.
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.

Test Method

- Step 1** Let all reagents equilibrate at room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a qualitative determination use only the Ready to Use Low Calibrator D (vial with yellow cap).
or For a **semi-quantitative determination** use the Ready to Use Calibrators A through D as depicted in the sample layout below.



- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of patient specimen by pipetting **5µl** of serum into **0.5 ml** of Serum Diluent. **Mix well.**
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to Use Calibrator, Positive and Negative controls and patient samples to the appropriate microwells as per sample layout below.
Note: Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank. The absorbance of the reagent blank should not be more than 0.3 when read against air.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (\pm 5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with the wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (\pm 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 7.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate to each well in the same order and timing as for the conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (\pm 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the enzyme substrate. Read absorbance within 1 hour of adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or 405/630nm dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrator, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3 . The calibrator A should

EN

have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <20 EU/ml. If the test is run in duplicate the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. While performing Qualitative determinations, the absorbance of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations the positive control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods.

1. QUALITATIVE DETERMINATION

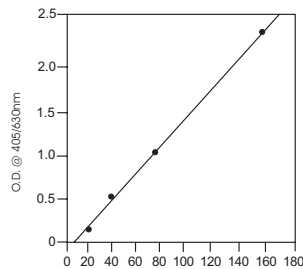
Abs. of Test Sample

----- X EU/ml of Calibrator = EU/ml Test Sample

Abs. of Calibrator

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration of EU/ml on the X-axis against the absorbance of the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.



Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be included with each run. Patient samples containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such serum samples should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values. These may vary with the population examined.

anti-Jo-1 conc.	Interpretation
< 20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	Positive

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Results obtained with the Immulisa™ anti-Jo-1 assay serve only as an aid in the overall diagnosis and should not be interpreted as diagnostic in themselves.



IMMCO
DIAGNOSTICS

Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά της Jo-1

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1151 Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά της rJo-1 96 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων κατά της Jo-1 σε ορό ανθρώπου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η *πολυμυοσίτιδα* και η *δερματομυοσίτιδα* συμπεριλαμβάνονται σε μια ετερογενή ομάδα επίκτητων μυικών παθήσεων που ονομάζονται *ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις μυοπάθειες*. Χαρακτηρίζονται από κεντρική και συχνά συμμετρική μυική αδυναμία, η οποία αναπτύσσεται σχετικά αργά. Οι ασθενείς με *ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις μυοπάθειες* ενδέχεται να εμφανίσουν μη ειδικά συμπτώματα, όπως κόπωση, αρθραλγία και μυαλγία, τα οποία μπορεί να προσμοιάσουν συμπτώματα άλλων διαταραχών και να προκαλέσουν σημαντικές καθυστερήσεις στη σωστή διάγνωση και την έναρξη της θεραπείας. Αυτοαντισώματα απαντούν στο 60-90% των ασθενών με *ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις μυοπάθειες* και η ανίχνευσή τους βοηθά το διαχωρισμό αυτών των μυοπαθειών από άλλες μορφές μυικών παθήσεων.

Στη μυοσίτιδα μπορούν να ανιχνευθούν δύο κύριες ομάδες αυτοαντισωμάτων: ειδικά για τη μυοσίτιδα αντισώματα και αντισώματα που δεν είναι ειδικά αλλά σχετιζόμενα¹⁻⁵.

Ειδικά στη μυοσίτιδα αντισώματα βρίσκονται στο 25-40% των ενηλίκων ασθενών με *ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις μυοπάθειες*. Ορισμένες συγκεντρώσεις αντισωμάτων, όπως αυτές των t-RNP συνθετασών, συσχετίζονται με τη δραστηριότητα της νόσου και εμφανίζουν κυτταροπλασματική αντίδραση σε κύτταρα HEp-2 και σε υποστρώματα διάφορων ιστών. Τα αντισώματα κατά της συνθετάσης ιστιδικού tRNA (Jo-1) είναι τα πιο κοινά. Οι ασθενείς που πάσχουν από μυοσίτιδα και είναι θετικοί στα αντισώματα κατά της Jo-1 εμφανίζουν παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά, κυρίως διάμεση πνευμονοπάθεια, πνευμονική ίνωση, φαινόμενο Raynaud, πυρετό και μη διαβρωτική, συμμετρική αρθρίτιδα μικρών αρθρώσεων.

Σχετιζόμενα με μυοσίτιδα αντισώματα, όπως τα αντισώματα κατά των U1-RNP, PM/Scl, Ku και SS-A(Ro) δεν εμφανίζονται μόνο στη μυοσίτιδα, αλλά και σε άλλες διαταραχές του συνδετικού ιστού. Αυτά τα αυτοαντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν με διάφορες μεθόδους, όπως η διάχυση σε πήκτωμα, η ανοσοαποτύπωση Western ή η μέθοδος ELISA.

ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Η ανάλυση διενεργείται ως ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση (ELISA) στερεάς φάσης. Οι μικροκυψελίδες επικαλύπτονται με κεκαθαρισμένο αντιγόνο Jo-1. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των ειδικών αντισωμάτων αντι-Jo-1 του ορού. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν ανιχνεύονται με την προσθήκη στις κυψελίδες σημασμένου με ένζυμο συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης IgG. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος pNPP σε ένα έγχρωμο προϊόν αντίδρασης.

Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται από ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.** Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Οι επικαλυμμένες μικροκυψελίδες προορίζονται για μία μόνο χρήση.

Προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹³.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μικροβιακής ή διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό τους. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά της rJo-1 ImmuLISA™ **REF** 1151

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.









12 x 8	MICROPLATE rJo-1	Πλακίδιο ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με το αντιγόνο Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A Jo-1 *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής A (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B Jo-1 *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής B (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C Jo-1 *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής C (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D Jo-1 *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής D (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του Jo-1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + Jo-1 *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για αντισώματα κατά του Jo-1.

EL

1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα αρνητικού ελέγχου (λευκό πύμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	DIL *	Έτοιμο προς χρήση αραιωτικό διάλυμα ορού . Χρώματος μπλε.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Έτοιμο προς χρήση ενζυμικό υπόστρωμα . Περιέχει p-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). Να προστατεύεται από το φως.
1 x 12 ml	STOP	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα τερματισμού .
2 x	BUF WASH	Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

* Περιέχει < 0,1% NaN₃

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

-  Αριθμός παρτίδας
-  Αριθμός καταλόγου
-  Ημερομηνία λήξης
-  Θερμοκρασία αποθήκευσης
-  Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης
-  In vitro διαγνωστική χρήση
-  Κατασκευαστής
-  Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης ή αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl
- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικά χαρτιά
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλου βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση

της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις της διαδικασίας

- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος.
- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια της ανάλυσης να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Επιστρέψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών πρέπει να προετοιμαστούν προτού ξεκινήσει η ανάλυση.
- Είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής έκπλυσης. Εάν η έκπλυση δεν εκτελείται αυτόματα, επαρκής έκπλυση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας μια ισχυρή ριπή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από μια φιάλη έκπλυσης με ευρύ ακροφύσιο κατά μήκος ολόκληρου του πλακιδίου. Συνιστάται η χρήση μιας αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Σε όλα τα βήματα είναι σημαντικός ο προσεκτικός έλεγχος των χρόνων. Όλες οι περίοδοι επώασης ξεκινούν με την ολοκλήρωση της προσθήκης του αντιδραστηρίου.
- Η προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με τον ίδιο ρυθμό και με την ίδια σειρά.
- Αφαιρέστε από τη θήκη τις απαιτούμενες ταινίες μικροκυψελίδων και επανασφραγίστε προσεκτικά τη θήκη, ώστε να αποτραπεί τυχόν συμπίκνωση υδρατμών στις αχρησιμοποίητες μικροκυψελίδες. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.

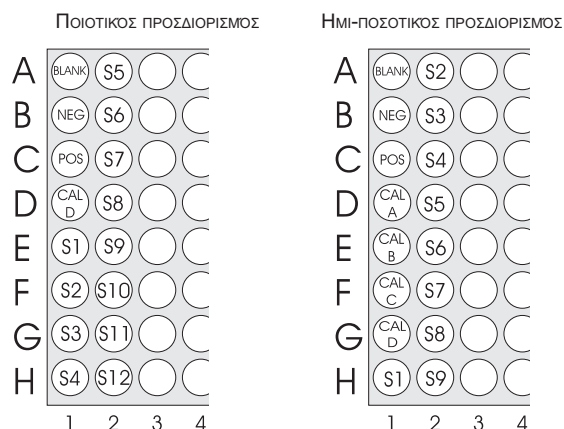
Μέθοδος ανάλυσης

Βήμα 1 Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Βήμα 2 Σημάνετε το φύλλο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στις μικροκυψελίδες. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.

Βήμα 3 Για ποιοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήστε μόνο τον έτοιμο προς χρήση Βαθμονομητή D (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα)

ή Για ημι-ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήστε τους έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές A έως D, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω δειγματοληπτική διαμόρφωση.



EL

- Βήμα 4** Προετοιμάστε μια αραιώση του δείγματος ασθενούς σε αναλογία **1:101**, προσθέτοντας **5 μl** ορού σε **0,5 ml** αραιωτικού διαλύματος ορού. **Αναμίξτε επιμελώς.**
- Βήμα 5** Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκυψελίδες από τη θήκη και επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες που υπάρχουν στη σφραγισμένη θήκη, στο ψυγείο. Τοποθετήστε σταθερά τις μικροκυψελίδες στο πλαίσιο στήριξης που διατίθεται.
- Βήμα 6** Προσθέστε με πιπέτα **100 μl** έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και δειγμάτων ασθενών στις κατάλληλες μικροκυψελίδες, όπως στην παρακάτω διαμόρφωση δειγματοληψίας.
Σημείωση: Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου. Η απορρόφηση του τυφλού αντιδραστήριου δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,3 όταν μετράται έναντι του αέρα.
- Βήμα 7** Επώαστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 8** Εκπλύνετε **4x** με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Για μη αυτόματη έκπλυση, πληρώστε κάθε μικροκυψελίδα με ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας το πλακίδιο και κτυπώντας το ελαφρά ώστε να αδειάσουν όλες οι κυψελίδες ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κυψελίδα. Για να στυπώσετε στο τέλος της τελευταίας έκπλυσης, αναστρέψτε τις ταινίες και κτυπήστε δυνατά τις κυψελίδες επάνω σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές έκπλυσης, προγραμματίστε τη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 10** Επώαστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 11** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 7.
- Βήμα 12** Προσθέστε **100 μl** ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 13** Επώαστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 14** Προσθέστε **100 μl** διαλύματος τερματισμού σε κάθε μικροκυψελίδα με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το ενζυμικό υπόστρωμα. Διαβάστε την απορρόφηση εντός 1 ώρας από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 15** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **405 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος 405/630 nm, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της εξέτασης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι $<0,3$. Ο Βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή <20 EU/ml. Εάν η ανάλυση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η απορρόφηση του Βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους.

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

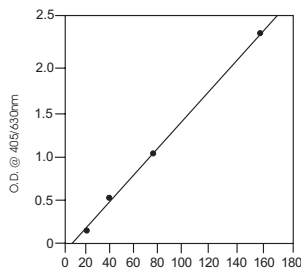
Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος

----- X EU/ml του βαθμονομητή = EU/ml εξεταζόμενου δείγματος

Απ/ση του Βαθμονομητή

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών Α έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε EU/ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησής τους.



Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή Α. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν επί το συντελεστή αραιώσης.

Ερμηνεία

Τα παρακάτω παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές. Οι τιμές αυτές ενδέχεται να ποικίλλουν σε κάθε πληθυσμό που αναλύεται.

Συγκεντρ. αντι-Jo-1	Ερμηνεία
<20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Απροσδιόριστο (οριακό)
>25 EU/ml	Θετικό

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με την ανάλυση αντισωμάτων αντι-Jo-1 Immulisa™ υποβοηθούν μόνο τη συνολική διάγνωση και δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται από μόνα τους ως διαγνωστικά.

ES



IMMCO
DIAGNOSTICS

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI Jo-1 ELISA

IVD

PROSPECTO

REF 1151 Anti-r-Jo-1 Antibody ELISA 96 análisis

USO PREVISTO

Enzimoimmunoensayo (ELISA) para la detección y semicuantificación de anticuerpos anti Jo-1 en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La *polimiositis* y la *dermatomiositis* constituyen un grupo heterogéneo de patologías musculares adquiridas denominadas *miopatías inflamatorias idiopáticas*. Se caracterizan por una debilidad muscular proximal y frecuentemente simétrica que se desarrolla con relativa lentitud. Los pacientes afectados de *miopatías inflamatorias idiopáticas* pueden presentar síntomas no específicos tales como fatiga, artralgia y mialgia, que pueden parecerse a otros trastornos y provocar un retardo significativo en el diagnóstico y consiguiente aplicación del tratamiento. En el 60-90% de pacientes que padecen *miopatías inflamatorias idiopáticas* se encuentran autoanticuerpos; detectarlos es una herramienta valiosa para distinguir estas miopatías de otras formas de trastornos musculares.

En la miositis se detectan dos grandes grupos de autoanticuerpos: anticuerpos específicos de miositis y anticuerpos no específicos aunque asociados¹⁻⁵.

Los anticuerpos específicos de miositis se presentan en el 25-40% de pacientes adultos con *miopatías inflamatorias idiopáticas*. Determinadas concentraciones de anticuerpos, incluidos los anti-sintetasas t-RNP, se relacionan con la actividad patológica y muestran reacción citoplasmática en células HEp-2 y diferentes tejidos sustrato. Los anticuerpos anti-histidil-tRNA sintetasa (Jo-1) son los más comunes. Los pacientes con miositis que resultan positivos a anticuerpos anti Jo-1 muestran características clínicas similares, especialmente patologías intersticiales de pulmón, fibrosis pulmonar, fenómeno de Raynaud, fiebre y artritis simétrica no erosiva de las pequeñas articulaciones.

Los anticuerpos asociados a la miositis incluyen anticuerpos U1-RNP, PM/Scl, Ku y SS-A(Ro) y no se presentan solamente en la miositis sino también en otras patologías del tejido conectivo. Estos auto anticuerpos pueden ser detectados por diferentes métodos tales como difusión por gel, Western Blot o ELISA.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El análisis consiste en un inmunoensayo de fase sólida marcado con enzima (ELISA). Los pocillos se recubren con antígeno purificado Jo-1. Se incuban los controles, calibradores y muestras de suero del paciente en los pocillos recubiertos de antígeno permitiendo que los anticuerpos específicos anti-Jo-1 presentes en el suero se unan. Los anticuerpos no unidos y demás proteínas del suero se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se detectan mediante un conjugado de IgG antihumano marcado con un enzima añadido a los pocillos. El conjugado que no se ha unido se elimina mediante lavado. Luego se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP). La presencia de anticuerpos se detecta por el cambio de color provocado por la conversión del sustrato pNPP. Se detiene la reacción y con un espectrofotómetro se lee la intensidad del cambio de color a 405nm, que es proporcional a la concentración del anticuerpo. Los resultados se expresan en unidades ELISA (EU)/ml.

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conservar los reactivos a 2-8°C. **No los congele.** No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C). Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad. Reconstituya el tampón de

lavado hasta un litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

Precauciones

Para diagnóstico *in vitro*. Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCB). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales¹³.

ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN_3) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto. No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

Material suministrado









ELISA para anticuerpos Anti-rJo-1 ImmuLisa™ **REF** 1151

El kit contiene reactivos suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	MICROPLATE rJo-1	Microplaca con micropocillos individuales separables recubiertos con antígeno Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A Jo-1 *	Calibrator A listo para usar (<i>tapa verde</i>). Suero humano que contiene anticuerpos Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B Jo-1 *	Calibrator B listo para usar (<i>tapa morada</i>). Suero humano que contiene anticuerpos Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C Jo-1 *	Calibrator C listo para usar (<i>tapa azul</i>). Suero humano que contiene anticuerpos Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D Jo-1 *	Calibrator D listo para usar (<i>tapa amarilla</i>). Suero humano que contiene anticuerpos Jo-1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + Jo-1 *	Control Positivo listo para usar (<i>tapa roja</i>). Suero humano positivo a anticuerpos anti Jo-1.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Control Negativo listo para usar (<i>tapa blanca</i>). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPPOS *	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de suero listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático listo para usar. Contiene pNPP. Protéjase de la luz.
1 x 12 ml	STOP	Solución Stop lista para usar.
2 x	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro.

* Contiene <0.1% NaN_3

Símbolos utilizados en las etiquetas:

-  Número de lote
-  Número de catálogo
-  Fecha de caducidad
-  Temperatura de conservación
-  Léanse las instrucciones de uso
-  Para diagnóstico *in vitro*
-  Fabricante
-  Número de análisis

Materiales necesarios no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido, o bien lavador automático de microplacas con capacidad de 200µl
- Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO**Advertencias preliminares**

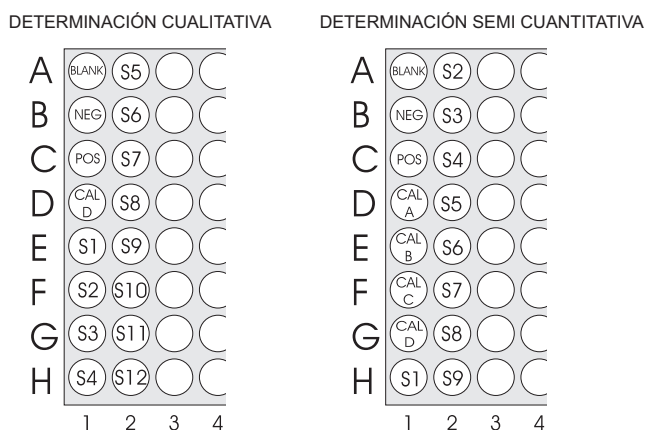
- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente antes de dar comienzo a la prueba. Vuelva a poner de inmediato en la nevera los materiales y muestras no utilizados.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- Una buena técnica de lavado es crucial. Si efectúa el lavado manualmente, rocíe toda la microplaca con un fuerte chorro de solución de lavado, utilizando una botella de boca ancha. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.

ES

- Las muestras y reactivos deben añadirse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
- Saque las tiras de pocillos de su sobre y ciérrelo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.

Procedimiento del ensayo

- Paso 1** Los reactivos deben estar a temperatura ambiente.
- Paso 2** Señale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.
- Paso 3** Para la **determinación cualitativa**, use únicamente el Low Calibrator D (*vial de tapa amarilla*) listo para usar. Para la **determinación semi cuantitativa**, use los calibradores de A a D listos para usar como se muestra en el ejemplo siguiente:



- Paso 4** Prepare una dilución de **1:101** de la muestra del paciente, pipeteando **5µl** de suero en **0,5 ml** de diluyente de suero. **Mezcle bien.**
- Paso 5** Coja los pocillos necesarios del sobre, ciérrelo bien y póngalo nuevamente en la nevera de inmediato. Ponga los pocillos en el soporte suplementario
- Paso 6** Pipetee **100 µl** de calibrador listo para usar, controles positivo y negativo y muestras de paciente en los correspondientes pocillos, como se indica más abajo
Nota: Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo. La absorbancia de este pocillo no debe ser superior a 0,3 leída contra el aire.
- Paso 7** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** Lave **4 veces** con el tampón de lavado. Para lavado manual, llene cada pocillo con el tampón de lavado reconstituido. Elimine el líquido invirtiendo y sacudiendo el pocillo, o bien aspire el líquido de cada pocillo. Al terminar el último lavado, invierta las tiras y sacúdalas enérgicamente sobre papel absorbente. Si utiliza un lavador automático, programe el ciclo de lavado siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Paso 9** Pipetee **100 µl** de conjugado en los pocillos.
- Paso 10** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave los pocillos repitiendo el paso 8.
- Paso 12** Pipetee **100 µl** de substrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.
- Paso 13** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

ES

Paso 14 Pipetee **100 µl** de solución Stop en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el sustrato enzimático. Lea la absorbancia en el plazo de una hora después de haber añadido la solución Stop.

Paso 15 Lea la absorbancia de cada pocillo a **405 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 405/630nm comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

Control de calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser <0,3. La lectura de absorbancia del calibrador A no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <20 EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de ambas lecturas para determinar las EU/ml. Cuando se efectúan determinaciones cualitativas, la absorbancia del calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

RESULTADOS

Cálculo

Las concentraciones en la muestra del paciente se pueden determinar mediante dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

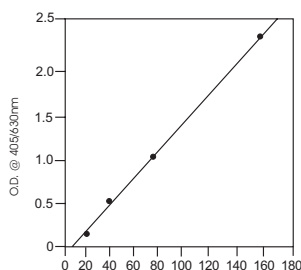
Abs. de muestra analizada

----- X EU/ml de calibrador D = EU/ml muestra analizada

Abs. de calibrador

2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en EU/ml en el eje X en relación a la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.



Calibrador

Los calibradores listos para usar proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

ES

Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales, que podrían variar según la población examinada.

Concent. anti-Jo-1	Interpretación
< 20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Incierto (borderline)
>25 EU/ml	Positivo

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los resultados obtenidos con el ensayo anti-Jo-1 Immulisa™ son sólo una herramienta de ayuda en el diagnóstico general y no deben considerarse como diagnósticos por sí mismos.



Anti-Jo-1-Antikörper-ELISA

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1151 Anti-rJo-1-Antikörper-ELISA 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die Semi-Quantifizierung von Antikörpern gegen Jo-1 in Humanserum

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Polymyositis und *Dermatomyositis* gehören zu einer heterogenen Gruppe von erworbenen Muskelerkrankungen, die als *idiopathische inflammatorische Myopathien* bezeichnet werden. Diese sind durch proximale und häufig symmetrische Muskelschwäche gekennzeichnet, die sich relativ langsam entwickelt. Patienten mit *idiopathischen inflammatorischen Myopathien* können sich mit unspezifischen Symptomen präsentieren, z.B. Müdigkeit, Gelenkschmerzen und Muskelschmerzen, die andere Erkrankungen vortäuschen und zu erheblichen Verzögerungen bei der korrekten Diagnose und dem Beginn der Behandlung führen können. Autoantikörper treten bei etwa 60-90% der Patienten mit *idiopathischen inflammatorischen Myopathien* auf, und ihr Nachweis kann dabei helfen, diese Myopathien von anderen Arten von Muskelerkrankungen zu unterscheiden.

Bei Myositis können zwei größere Gruppen von Autoantikörpern nachgewiesen werden: Myositis-spezifische Antikörper und Antikörper, die nicht spezifisch aber verbunden sind¹⁻⁵.

Myositis-spezifische Antikörper liegen bei 25-40% der erwachsenen Patienten mit *idiopathischen inflammatorischen Myopathien* vor. Gewisse Antikörperkonzentrationen, einschließlich Antikörper gegen r-RNP-Synthetasen, korrelieren mit der Krankheitsaktivität und zeigen zytoplasmatische Reaktionen auf HEp2-Zellen und verschiedenen Gewebesubstraten. Am häufigsten treten die Anti-Histidyl-tRNA-Synthetase-Antikörper (Jo-1-Antikörper) auf. Patienten mit Myositis und Patienten mit positiven Tests auf Jo-1-Antikörper zeigen ähnliche klinische Merkmale, insbesondere interstitielle Lungenkrankheit, Lungenfibrose, Raynaud-Syndrom, Fieber und nicht-erosive, symmetrische Arthritis kleiner Gelenke.

Myositis-verbundene Antikörper, einschließlich U1-RNP-, PM/Scl-, Ku- und SS-A/Ro-Antikörper, treten nicht nur bei Myositis, sondern auch bei anderen Bindegewebskrankheiten auf. Diese Antikörper können mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden, darunter Geldiffusion, Western Blot oder ELISA.

TESTPRINZIP

Der Test wird als Festphasen-ELISA durchgeführt. Mikrotiterplattenvertiefungen werden mit gereinigten Jo-1-Antigenen beschichtet. Kontrollseren, Kalibratoren und Serumproben von Patienten werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert; dies erlaubt die Bindung der im Serum vorhandenen spezifischen Anti-Jo-1-Antikörper. Nicht gebundene Antikörper und andere Serumeiweiße werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-Human-IgG-Konjugats in die Vertiefungen nachgewiesen. Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antikörpern wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht.

Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) angegeben.

REAGENZIEN

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.** Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Die beschichteten Mikrotitervertiefungen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹³.

WARNUNG – Natriumazid (NaN₃) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metalazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer. Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

Mitgelieferte Materialien

ImmuLisa™ Anti-rJo-1-Antikörper-ELISA **REF** 1151

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen.





12 x 8	MICROPLATE rJo-1	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit Jo-1-Antigen beschichtet
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A Jo-1 *	Gebrauchsfertiger Kalibrator A (<i>grüne Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B Jo-1 *	Gebrauchsfertiger Kalibrator B (<i>lila Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C Jo-1 *	Gebrauchsfertiger Kalibrator C (<i>blaue Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D Jo-1 *	Gebrauchsfertiger Kalibrator D (<i>gelbe Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Jo-1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + Jo-1 *	Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (<i>rote Kappe</i>). Enthält Jo-1-Antikörper-positives Humanserum.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (<i>weiße Kappe</i>). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.

DE

1 x 60 ml	DIL *	Gebrauchsfertiger Serumverdünner . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Gebrauchsfertiges Enzymsubstrat . Enthält pNPP. Vor Licht schützen .
1 x 12 ml	STOP	Gebrauchsfertige Stopplösung .
2 x	BUF WASH	Waschpuffer in Pulverform . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

* Enthält <0,1% NaN₃

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

-  Chargennummer
-  Bestellnummer
-  Verwendbar bis
-  Lagerungstemperatur
-  Gebrauchsanleitung lesen
-  In-vitro-Diagnostikum
-  Hersteller
-  Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer oder automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200µl
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig den Beipacktext, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Warten Sie vor Beginn des Testverfahrens, bis die Serumproben und Testreagenzien Raumtemperatur erreicht

haben. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.

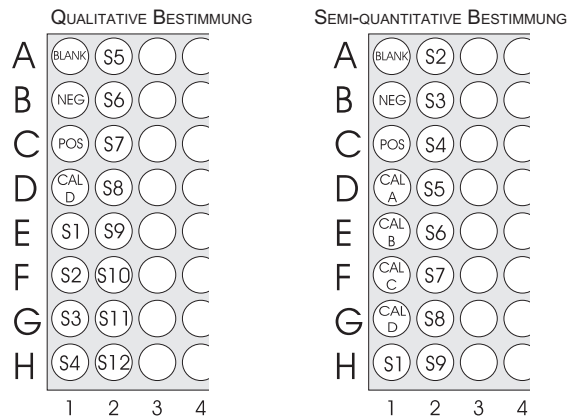
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.
- Eine gute Waschmethode ist unerlässlich. Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschpuffer über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.

Testmethode

Schritt 1 Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.

Schritt 2 Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.

Schritt 3 Verwenden Sie für eine **qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen niedrigen Kalibrator D (Fläschchen mit gelber Kappe).
oder Verwenden Sie für eine **semi-quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis D, wie in der Beispielanordnung unten angezeigt.



Schritt 4 Verdünnen Sie die Patientenprobe im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** des Serums in **0,5 ml** Probenverdünner pipettieren. **Gut mischen**.

Schritt 5 Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank. Setzen Sie die Vertiefungen sicher in den mitgelieferten Halter ein.

Schritt 6 Pipettieren Sie **100 µl** des gebrauchsfertigen Kalibrators, der positiven und negativen Kontrollseren sowie der Patientenproben wie auf der Probenanordnung unten angezeigt in die entsprechenden Vertiefungen.

Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null. Die gegen Luft abgelesene Extinktion der Blindprobe sollte nicht größer als 0,3 sein.

- Schritt 7** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 8** Waschen Sie **4x** mit Waschpuffer. Wenn Sie manuell waschen, füllen Sie jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.
- Schritt 9** Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.
- Schritt 10** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 11** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 8 beschrieben.
- Schritt 12** Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.
- Schritt 13** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 14** Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie den Extinktionswert innerhalb 1 Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.
- Schritt 15** Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **405 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 405/630 nm.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte $<0,3$ sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die EU/ml zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Bei semi-quantitativen Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

ERGEBNISSE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Ext. der Testprobe

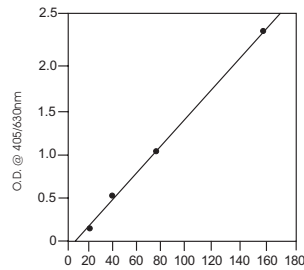
Ext. von Kalibrator D

X EU/ml des Kalibrators = EU/ml Testprobe

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.

DE



Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen, und müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als der Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte zu bestimmen, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorenkurve fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Ergebnisse. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen. Diese können je nach der untersuchten Patientenpopulation schwanken.

Anti-Jo-1-Konz.	Interpretation
< 20 EU/ml	negativ
20-25 EU/ml	unbestimmt (Grenzbereich)
>25 EU/ml	positiv

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Die mit dem ImmuLisa™ Anti-Jo-1-Test erhaltenen Ergebnisse dienen nur als Hilfsmittel bei der Gesamtdiagnose und sollten nicht allein als diagnostisch gedeutet werden.



IMMCO
DIAGNOSTICS

Anticorps anti-Jo-1 ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1151 Anticorps anti-rJo ELISA 96 Tests

USAGE PREVU

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA destiné à la détection et la semi-quantification des anticorps anti-Jo-1 dans le sérum humain.

RESUME ET EXPLICATION

La *polymyosite* et la *dermatomyosite* comprennent un groupe hétérogène de maladies musculaires acquises appelées myopathies inflammatoires idiopathiques. Elles sont caractérisées par une faiblesse musculaire proximale et souvent symétrique qui se développe relativement lentement. Les patients atteints de myopathies inflammatoires idiopathiques peuvent présenter des symptômes non-spécifiques tels que fatigue, arthralgie et myalgie que peuvent imiter d'autres affections et se traduisent par des retards considérables quand il s'agit de poser un diagnostic correct et d'entreprendre un traitement. Des auto-anticorps se manifestent chez 60-90% des malades atteints de myopathies inflammatoires idiopathiques et leur découverte se révèle utile pour distinguer ces myopathies d'autres formes de maladies musculaires.

Deux grands groupes d'auto-anticorps peuvent être détectés dans la myosite : les anticorps spécifiques de la myosite et les anticorps qui ne sont pas spécifiques mais associés¹⁻⁵.

Les anticorps spécifiques de la myosite sont présents chez 25-40% des patients adultes atteints de *myopathies inflammatoires idiopathiques*. Certaines concentrations d'anticorps, y compris celles des anti-t-RNP synthétases, correspondent à une activité de la maladie et se manifestent par une réaction cytoplasmique sur les cellules HEp-2 et sur différents substrats du tissu. Les anticorps anti-histidyl-tRNA (Jo-1) synthétase sont les plus communs. Les patients atteints de myosite et qui sont positifs pour les anticorps Jo-1 manifestent un tableau clinique semblable, en particulier maladie interstitielle pulmonaire, fibrose pulmonaire, phénomène de Raynaud, fièvre et polyarthrite non-érosive des petites articulations.

Les anticorps associés à la myosite y compris les U1-RNP, PM/Scl, Ku et SS-A(Ro) se manifestent non seulement dans la myosite mais aussi dans les autres affections du tissu conjonctif. Ces auto-anticorps peuvent être détectés par plusieurs méthodes, tel que diffusion sur gel, Western Blot ou ELISA.

PRINCIPES DE LA METHODE

Le test est réalisé sous la forme d'une méthode immuno-enzymatique (solid phase enzyme labeled immunosorbent assay - ELISA) Des micropuits sont enduits d'antigène purifié Jo-1. Les régulateurs, les étalons et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits enduits d'antigène qui permettent aux anticorps spécifiques anti-Jo-1 qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques. Les anticorps agglutinés sont détectés en ajoutant un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain aux puits. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage. La phosphatase alcaline et son substrat (pNPP) sont ensuite ajoutés aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion de substrat du pNPP vers un produit de réaction coloré.

La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA par millilitre (EU)/ml.

REACTIFS

Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8°C. **Ne pas congeler.** Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité

est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant l'usage. Quand il est entreposé à 2-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration de l'équipement. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée. Les microplaques sont destinées à être utilisées une fois seulement.

Précautions

Destiné à un usage diagnostique *in vitro*. Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humains et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux¹³.

AVERTISSEMENT – L'azide de sodium (NaN₃) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue d'Immco Diagnostics Inc. Il faut respecter de bonnes pratiques de laboratoire pour limiter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs au moment de la manipulation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Matériel fourni

Anticorps ImmuLisa™ anti-rJo ELISA REF 1151

L'équipement contient des réactifs en suffisance pour procéder à 96 tests.

12 x 8	MICROPLATE rJo-1	Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A Jo-1 *	Etalon A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B Jo-1 *	Etalon B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C Jo-1 *	Etalon C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D Jo-1 *	Etalon D (<i>couvercle jaune</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- Jo-1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + Jo-1 *	Régulateur positif (<i>couvercle rouge</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- Jo-1.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Régulateur négatif (<i>couvercle blanc</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines . Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL *	Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.

FR

1 x 12 ml **SUBSTRATE** *

Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. **Protéger de la lumière.**

1 x 12 ml **STOP**

Solution d'arrêt prête à l'emploi.

2 x **BUF WASH**

Poudre **Wash Buffer** (solution de lavage). Reconstituer dans un litre chacun.


* Contient <0.1% NaN₃

Symboles utilisés sur les étiquettes:

LOT Numéro de lot

REF Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant

 Température de conservation

 Lire les instructions d'utilisation

IVD Pour usage diagnostique In vitro

 Fabricant

 Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée ou dispositif de lavage de microplaques automatique en mesure de dispenser 200µl
- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes de test
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.

RECOLTE DES SPECIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou atteints de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROCEDURE

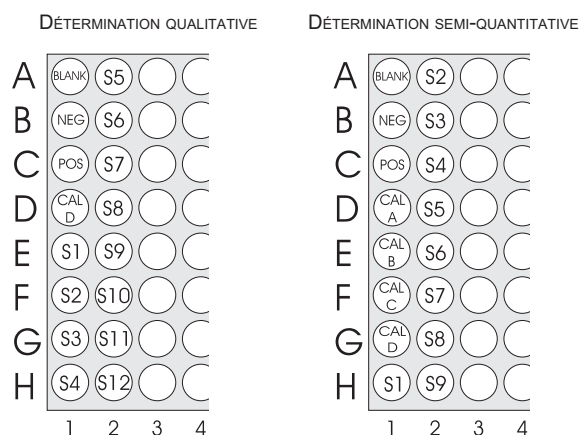
Notes de procédure

- Avant de commencer le test, lire avec soin la brochure qui accompagne le produit.
- Conserver les spécimens de sérum et les réactifs de test à température ambiante avant d'entreprendre la procédure de test. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.

- Toutes les dilutions des échantillons des patients doivent être préparées avant de commencer l'essai.
- Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. Si le lavage est réalisé manuellement, il est fait de manière adéquate en dirigeant un flux puissant de solution de lavage avec un flacon-laveur à pointe large à travers toute la microplaque. On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit avoir lieu au même taux et selon la même séquence.
- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.

Méthode de test

- Etape 1** Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante.
- Etape 2** Étiqueter la feuille de protocole pour indiquer le placement de l'échantillon dans les puits. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.
- Etape 3** Pour une détermination qualitative, utiliser seulement le Étalon Bas D prêt à l'emploi (flacon avec couvercle jaune).
ou Pour un **dosage semi-quantitatif**, utiliser les étalons A à D prêts à l'emploi comme montré dans le schéma d'échantillon figurant ci-dessous.



- Etape 4** Préparer une dilution **1:101** de spécimen patient en pipétant **5µl** de sérum dans **0.5 ml** de diluant de sérum. **Bien mélanger.**
- Etape 5** Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet de bourse et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer solidement les microplaques à puits dans le support fourni comme accessoire.
- Etape 6** Pipeter **100 µl** de étalon prêt à l'emploi, de régulateur positif et négatif et d'échantillons patient dans les puits appropriés comme dans le schéma de l'échantillon ci-dessus.
Note : Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif blanco. Mettre à zéro le lecteur ELISA sur le réactif blanco. L'absorption du réactif blanco ne doit pas être supérieure à 0,3 quand elle est mesurée par rapport à l'air.
- Etape 7** Incuber pendant 30 minutes (± 5 min) à température ambiante.

- Etape 8** Laver **4x** avec de la solution de lavage. En cas de lavage manuel, remplir chaque puits avec de la solution de lavage reconstituée. Éliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque puits ou en aspirant le liquide de chaque puits. Pour absorber à la fin du dernier lavage, renverser les bandes et tapoter vigoureusement les puits sur les serviettes de papier absorbant. Dans le cas de dispositifs de lavage automatiques, programmer le dispositif de lavage en suivant les instructions du fabricant.
- Etape 9** Pipeter **100 µl** de conjugué dans les microplaques à puits.
- Etape 10** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 11** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 7.
- Etape 12** Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrage que pour le conjugué.
- Etape 13** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 14** Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puits, en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de 1 heure après l'addition de la solution d'arrêt.
- Etape 15** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif blanco programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

Des étalons, des régulateurs positif et négatif et un réactif blanco doivent être utilisés à chaque test pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif blanco doit être inférieure à 0,3. L'étalon A doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures devrait être prise pour déterminer EU/ml. Quand on procède aux dosages qualitatifs, l'absorption de l'étalon D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs dans la plage figurant sur le flacon.

RESULTATS

Calculs

Les concentrations des échantillons patient peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

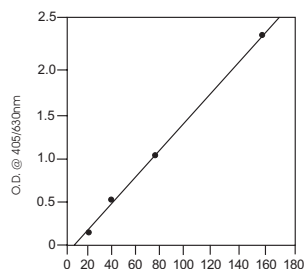
1. DOSAGE QUALITATIF

$$\frac{\text{Abs. de l'échantillon d'essai}}{\text{Abs. de l'étalon}} \times \text{EU/ml de l'étalon} = \text{EU/ml échantillon d'essai}$$

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption des étalons A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en EU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe optimale. Déterminer les concentrations des échantillons patient de la courbe par rapport à la valeur d'absorption correspondante.

FR



Etalon

Les étalons prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patient qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux de l'étalon A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent en outre être dilués, de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe de l'étalon quand on refait le test. Pour la détermination EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

Interprétation

Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales. Celles-ci peuvent varier en fonction de la population examinée.

anti-Jo-1 conc.	Interprétation
< 20 EU/ml	Négatif
20-25 EU/ml	Indéterminé (cas limite)
>25 EU/ml	Positif

LIMITES DE LA PROCEDURE

Les résultats obtenus à l'aide du test ImmuLisa™ anti-Jo-1 servent seulement comme aide pour poser le diagnostic général et ne devraient pas être interprétés comme un diagnostic par eux-mêmes.



Anticorpi Anti-Jo-1 ELISA

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1151 Anticorpi Anti-rJo-1 ELISA 96 Determinazioni

FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la rilevazione e la semiquantificazione di anticorpi anti-Jo-1 nel siero umano.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La polimiosite e la dermatomiosite abbracciano un gruppo eterogeneo di malattie muscolari ereditarie conosciute come miopatie infiammatorie idiopatiche. Sono caratterizzate da debolezza dei muscoli prossimali, spesso simmetrica che si sviluppa piuttosto lentamente. I pazienti con miopatie infiammatorie idiopatiche possono presentare sintomi non specifici quali, stanchezza, artralgia e mialgia, mimando così altri disturbi e potendo causare significativi ritardi nella formulazione di una diagnosi esatta e nell'inizio del trattamento adeguato. Gli anticorpi compaiono nel 60-90% dei pazienti con miopatie infiammatorie idiopatiche e la loro individuazione è di aiuto nella distinzione di queste miopatie da altre forme di patologie muscolari.

Nelle miositi si distinguono due principali gruppi di autoanticorpi: anticorpi miosite-specifici, e anticorpi che non mostrano specificità ma che sono comunque associati ad essa¹⁻⁵.

Gli anticorpi specifici per la miosite sono presenti nel 25-40% dei pazienti adulti con miopatia infiammatoria idiopatica. Le concentrazioni di alcuni anticorpi, includendo quelli contro la t-RNA sintetasi, sono collegati all'attività della malattia e mostrano reazioni citoplasmatiche su cellule epiteliali HEp-2 e su vari altri substrati tissutali. Gli anticorpi anti-istidil-tRNA sintetasi (Jo-1) sono i più comuni. I pazienti con miosite e positivi agli anticorpi Jo-1 mostrano caratteristiche cliniche simili, particolarmente malattia interstiziale del polmone, fibrosi polmonare, fenomeno di Raynaud, febbre e artrite non erosiva simmetrica delle piccole articolazioni.

Gli anticorpi associati alla miosite, inclusi U1-RNP, PM/Scl, Ku e SS-A(Ro) compaiono non solo nei casi di miosite, ma sono associati anche con altri disturbi del tessuto connettivo. Questi autoanticorpi possono essere individuati utilizzando varie metodologie, ad esempio il metodo di diffusione su gel, l'immunofissazione o il metodo ELISA.

PRINCIPI DELLE METODICHE

Il test viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida. I pozzetti sono rivestiti con antigene Jo-1 purificato. Controlli, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, ciò permette agli anticorpi specifici Jo-1 presenti nel siero di legarsi. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati sono rilevati da un anticorpo anti IgG umane marcato con un enzima aggiunto ai pozzetti. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi viene indicata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato pNPP.

La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in unità ELISA (EU)/ml.

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.** Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Le strisce con i pozzetti sono monouso.

Precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali¹³.

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN₃) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Seguire una buona prassi di laboratorio per ridurre al minimo la contaminazione microbica e crociata di reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Materiali forniti

Anticorpi Anti-rJo-1 ELISA ImmuLisa™ **REF** 1151

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	MICROPLATE rJo-1	Micropiastra con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene Jo-1
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A Jo-1 *	Calibratore A (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-Jo-1
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B Jo-1 *	Calibratore B (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-Jo-1
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C Jo-1 *	Calibratore C (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-Jo-1
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D Jo-1 *	Calibratore D (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-Jo-1
1 x 1,5 ml	CONTROL + Jo-1 *	Controllo Positivo (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo agli anticorpi anti-Jo-1.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umane pronto all'uso ; di colore rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluente siero pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato Enzimatico pronto all'uso . Contiene pNPP. Proteggere dalla luce.
1 x 12 ml	STOP	Soluzione di Stop pronta all'uso.
2 x	BUF WASH	Tampone di Lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

* Contiene < 0,1% NaN₃

Simboli usati sulle etichette:


LOT Numero di lotto

REF Numero catalogo

 Scadenza

IT

 Temperatura di conservazione

 Leggere le istruzioni per l'uso

 Uso diagnostico in vitro

 Produttore

 Numero di test

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua distillata o deionizzata
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito o lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl
- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Timer
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

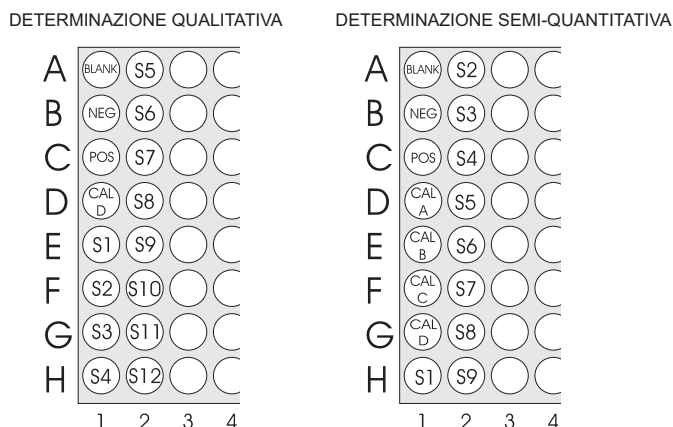
PROCEDURA

Note sul test

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i campioni e reagenti non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga su tutta la micropiastra. Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e il tempo di incubazione più uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta di reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti dovrebbe essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
- Togliere le strisce necessarie dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati. Trasferire immediatamente la busta in frigo.

Metodo del test

- Fase 1** Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.
- Fase 2** Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Fase 3** Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Low Calibrator D pronto all'uso (fiala con tappo giallo), **mentre** per una determinazione **semi-quantitativa** usare i Calibratori da A a D pronti all'uso come illustrato nell'esempio di disposizione dei campioni riportato sotto:



- Fase 4** Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente pipettando **5 µl** di siero in **0,5 ml** di Diluente del Campione. **Miscelare bene.**
- Fase 5** Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo. Sistemare in modo sicuro i pozzetti nel supporto extra fornito di corredo.
- Fase 6** Pipettare **100 µl** di Calibratore pronto all'uso, di Controllo Positivo e Negativo e di campioni del paziente negli appositi pozzetti come indicato nello schema riportato sopra.
Nota: Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco. L'assorbanza del bianco non deve essere superiore a 0,3.
- Fase 7** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Eliminare il liquido capovolgendo e sbattendo i contenuti da ciascun pozzetto o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e battere vigorosamente i pozzetti su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatico, programmare il dispositivo secondo le istruzioni del produttore.
- Fase 9** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 10** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 11** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 7.
- Fase 12** Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 13** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 14** Pipettare **100 µl** di Soluzione di stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
- Fase 15** Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

Controllo di Qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere <0,3. Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore <20 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le EU/ml si deve prendere la media delle due letture. Se si eseguono le determinazioni qualitative, l'assorbanza del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore di quella del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

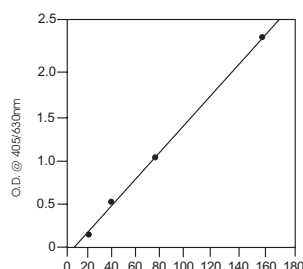
Assorbanza del campione del test

----- X EU/ml di Calibratore D = EU/ml del Campione

Assorbanza del calibratore

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.



Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali che possono variare in base alla popolazione esaminata.

Conc. anti-Jo-1	Interpretazione
< 20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Borderline
>25 EU/ml	Positivo

LIMITAZIONI DEL TEST

I risultati ottenuti con il test anti-Jo-1 Immulisa™ rappresentano unicamente un elemento di supporto alla diagnosi, ma considerati singolarmente non hanno valenza diagnostica.



IMMCO
DIAGNOSTICS

ELISA Anticorpos Anti-Jo-1

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1151 ELISA para Anticorpos Anti-rJo-1 96 Determinações

APLICAÇÃO

É um teste de imun absorção enzimática (ELISA) para a detecção e semiquantificação de anticorpos anti-Jo-1 em soro humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A *Polimiosite* e a *dermatomiosite* fazem parte de um grupo heterogéneo de doenças musculares adquiridas chamadas *miopatias inflamatórias idiopáticas*. São caracterizadas por um enfraquecimento muscular proximal e muitas vezes simétrico que se desenvolve relativamente devagar. Os doentes com *miopatias inflamatórias idiopáticas* podem apresentar sintomas não específicos tais como cansaço, artralgia e mialgia, as quais podem induzir outras doenças e provocar atrasos consideráveis num diagnóstico correcto e início do tratamento. Os auto-anticorpos apresentam-se em 60 a 90% dos doentes com *miopatias inflamatórias idiopáticas* e a sua detecção é útil para distinguir essas miopatias de outras formas de doenças dos músculos.

Na miosite podem ser detectados dois grupos principais de auto-anticorpos: anticorpos específicos da miosite e anticorpos que não são específicos mas associados¹⁻⁵.

Os anticorpos **específicos da Miosite** apresentam-se em 25 a 40% dos doentes adultos com *miopatias inflamatórias idiopáticas*. Certas concentrações de anticorpos, incluindo os sintetase t-RNP, têm uma correlação com a actividade da doença e mostram reacção citoplásmica nas células HEp-2 e variados substratos de tecido. Os anticorpos anti-histidil-tRNA sintetase (Jo-1) são os mais comuns. Os doentes com miosite e positivos aos anticorpos anti-Jo-1 mostram características clínicas semelhantes, especialmente na doença intersticial pulmonar, fibrose pulmonar, fenómeno de Raynaud, febre e artrite simétrica não erosiva das pequenas articulações.

Os anticorpos **associados à Miosite** incluindo os anticorpos U1-RNP, PM/ScI, Ku e SS-A(Ro) apresentam-se não só na miosite mas também noutras doenças do tecido conjuntivo. Estes auto-anticorpos podem ser detectados por vários métodos, tais com a difusão em gel, Western Blot ou ELISA.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é executado como imunoensaio de absorção enzimática de fase sólida. Os micropoços são revestidos com antigénio Jo-1 purificado. Os controlos, os calibradores e as amostras de soro do doente são incubados nos poços revestidos com antigénio o que permite a ligação específica dos anticorpos anti-Jo-1 presentes no soro. Os anticorpos que não se ligaram e as outras proteínas do soro são eliminados com a lavagem das micropoços. Os anticorpos que se ligaram são detectados juntando um conjugado de IgG anti-humana marcado com enzima aos poços. O conjugado que não se tiver ligado é eliminado por lavagem. Depois junta-se um Substrato enzimático específico (pNPP) aos poços e a presença de anticorpos é detectada por uma alteração da cor provocada pela conversão do substrato pNPP num produto de reacção colorido.

A reacção é interrompida e a intensidade de alteração da cor, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são apresentados em unidades ELISA por mililitro (UE/ml).

REAGENTES

Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congele.** Não utilize o reagente se não estiver límpido ou se apresentar precipitação. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20-25 °C) no momento da utilização. Quando é conservado entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade indicada no kit. Reconstituir o tampão de lavagem em 1 litro de água destilada ou desionizada. As tiras de micropoços revestidas só devem ser utilizadas uma vez.

Precauções

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHV, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Respeite as normas laboratoriais em matéria de conservação, distribuição e eliminação desses materiais¹³.

ATENÇÃO - ao azida de sódio (NaN₃) pode reagir com as tubagens de cobre ou chumbo para formar azidas metálicas muito explosivas. Na eliminação de líquidos, juntar quantidades abundantes de água para evitar a formação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director do laboratório ou o Centro Anti-Venenos.

As instruções devem ser seguidas exactamente como estão indicadas no folheto do kit para assegurar resultados válidos. Não misture componentes do kit com componentes de outras origens que não sejam do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Respeite as normas em vigor em matéria de processos laboratoriais para minimizar as possibilidades de contaminação microbiana ou química dos reagentes durante o seu manuseamento. Não use após a data de validade indicada no rótulo.

Materiais fornecidos









ELISA para Anticorpos Anti-rJo-1 ImmuLisa™ **REF** 1151

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8	MICROPLATE rJo-1	Microplaca com micropoços individuais destacáveis revestidos com antigénio Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A Jo-1 *	Calibrador A pronto a usar (<i>tampa verde</i>). Soro humano contendo anticorpos contra Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B Jo-1 *	Calibrador B pronto a usar (<i>tampa violeta</i>). Soro humano contendo anticorpos contra Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C Jo-1 *	Calibrador C pronto a usar (<i>tampa azul</i>). Soro humano contendo anticorpos contra Jo-1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D Jo-1 *	Calibrador D pronto a usar (<i>tampa amarela</i>). Soro humano contendo anticorpos contra Jo-1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + Jo-1 *	Controlo positivo pronto a usar (<i>tampa vermelha</i>). Contém soro humano positivo para anticorpos anti-Jo-1.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo pronto a usar (<i>tampa branca</i>). Contém soro humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz.
1 x 12 ml	STOP	Solução de paragem pronta a usar.
2 x	BUF WASH	Tampão de lavagem em pó. Reconstituir cada unidade em um litro.

* Contém < 0,1% NaN₃

Símbolos utilizados nos rótulos:

-  Número de lote
-  Número de catálogo
-  Prazo de validade
-  Temperatura de armazenamento
-  Ler as instruções de utilização
-  Utilização em diagnóstico in vitro
-  Fabricante
-  Número de testes

Materiais necessários mas não fornecidos

- Água destilada ou desionizada
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído ou lavador automático de microplacas com a capacidade de 200 µl
- Pipetas para 5 a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorvente
- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado para 600-650 nm.

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o rendimento do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras de 2 a 8 °C e por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

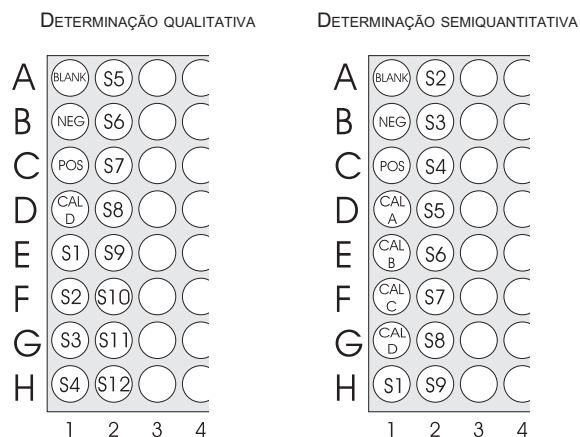
PROCEDIMENTO**Notas sobre o procedimento**

- Leia atentamente o folheto do produto antes de iniciar o teste.
- Deixe que as amostras de soro e os reagentes do teste estabilizem à temperatura ambiente antes de iniciar o teste. Guarde imediatamente no frigorífico todas as amostras e reagentes que não forem utilizados.
- As diluições das amostras do doente devem ser todas preparadas antes de iniciar o teste.
- É essencial uma boa técnica de lavagem. Se a lavagem for executada manualmente, o método de lavagem adequado é o de aplicar um jacto forte e directo de tampão de lavagem utilizando um frasco de lavagem com uma boca larga abrangendo toda a microplaca. Aconselha-se um lavador automático de microplacas.
- Use uma pipeta multicanal com capacidade de distribuição em 8 poços simultaneamente. Isso torna mais rápido o processo e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Em todos os passos é importante um cuidadoso controlo do tempo. O início de todos os períodos de incubação dá-se quando se adiciona o reagente.
- O adicionamento de todas as amostras e reagentes deve ser efectuado com a mesma proporção e com na mesma sequência.

- Retire do pacote as tiras de micropoços necessárias e feche bem o pacote para evitar condensação nos poços não utilizados. Guarde imediatamente o pacote no frigorífico.

Método do teste

- Passo 1** Deixe que todos os reagentes estabilizem à temperatura ambiente.
- Passo 2** Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nos poços. É aconselhável executar o teste nas amostras em duplicado.
- Passo 3** Para uma **determinação quantitativa** use somente o Calibrador D baixo, pronto a usar (*frasco com tampa amarela*).
ou Para uma **determinação semiquantitativa** use os Calibradores A a D, prontos a usar, como descrito no esquema abaixo.



- Passo 4** Prepare uma diluição a **1:101** das amostras do doente misturando **5 µl** de soro do doente com **0,5 ml** de Diluente para Soro. **Misture bem.**
- Passo 5** Retire do pacote os micropoços necessários e guarde no frigorífico o pacote selado com as tiras não utilizadas. Coloque correctamente os micropoços no suporte extra fornecido.
- Passo 6** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Calibradores, prontos a usar, Controlos Positivos e Negativos e amostras do doente diluídas nos respectivos micropoços como ilustrado no esquema das amostras acima
Nota: Inclua também um micropoço com **100 µl** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente. A absorvância do branco de reagente não deve ser superior a 0,3 quando lido em relação ao ar.
- Passo 7** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 8** Lave **4 vezes** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Elimine o fluido virando ao contrário e batendo com os dedos para eliminar o conteúdo de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para enxugar no fim da última lavagem, vire as tiras ao contrário e bata com força os poços em toalhetes de papel absorvente. Em caso de lavadores automáticos, programe o lavador de acordo com as instruções do fabricante.
- Passo 9** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- Passo 10** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 11** Lave todas as micropoços como no Passo 7.
- Passo 12** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempos, como descrito para o Conjugado.
- Passo 13** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.

PT

Passo 14 Com uma pipeta, deite **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço na mesma ordem e tempos descritos para o Substrato Enzimático. Leia os valores de absorvância no prazo de 1 hora depois de adicionar a Solução de Paragem.

Passo 15 Leia a absorvância de cada micropoço a **405 nm** usando um leitor de microplacas a comprimento de onda simples ou duplo a 405/630 nm em comparação com o branco de reagente definido em absorvância zero.

Controlo de qualidade

O Calibrador, os Controlos Positivo e Negativo e o branco de reagente devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvância do branco de reagente deverá ser < 0,3. O Calibrador A deverá ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário o teste deverá ser repetido. O controlo negativo deve ser < 20 UE/ml. Se o teste for efectuado em duplicado, para determinar UE/ml deverá ser calculada a média das duas leituras. Quando se efectuam determinações qualitativas, a absorvância do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à do controlo positivo. Para determinações semiquantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado na ampola.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras do doente podem ser determinadas em dois métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

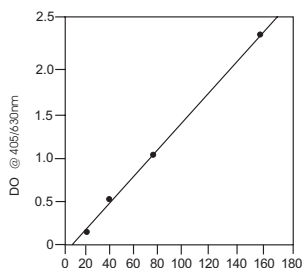
Abs. da Amostra de Teste

----- X UE/ml de Calibrador = UE/ml da Amostra de Teste

Abs. do Calibrador

2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Registe a absorvância dos Calibradores A a D em relação à respectiva concentração num papel milimétrico linear. Registe a concentração em UE/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e trace a curva de melhor ajuste. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva em relação ao correspondente valor de absorvância.



Calibrador

Os calibradores prontos a usar são incluídos para assegurar uma semiquantificação e devem ser usados em cada teste. As amostras dos doentes com níveis de anticorpos mais elevados devem dar valores de absorvância mais elevados do que os do Calibrador A. Para a determinação com precisão dos valores semiquantitativos essas amostras de soro devem ser mais diluídas de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando forem novamente testadas. Para a determinação de UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição.

Interpretação

As seguintes informações servem apenas como guia na interpretação dos resultados de laboratório. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais. Esses poderão variar em função da população examinada.

PT

Conc. anti-Jo-1	Interpretação
< 20 UE/ml	Negativo
20-25 UE/ml	Indeterminado (Limiar)
>25 UE/ml	Positivo

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Os resultados obtidos com o teste para anticorpos anti-Jo-1 ImmuLisa™ serve apenas como auxílio num diagnóstico geral e não deve ser interpretado como diagnóstico definitivo.

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol*; 1982, 33:167-240.
2. Tan EM. Special antibodies for the study of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum*; 1982, 25:753-756.
3. Tan EM, Chan E, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immun Immunopath*; 1988, 47:121-141.
4. Reichlin M. Current perspectives on serological reactions in SLE patients. *Clin Exp Immunol*; 1981, 44:1-10.
5. Reichlin M and Harley JB. Antibodies to extractable nuclear antigens: clinical significance. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed; 1987, 555-563.
6. Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity and the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1, Cruse JM and Lewis RE, Eds, Karger, Basel; 1985, 318-353.
7. McCarty GA. Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. *Medical Clinics of North America*; 1986, 70:237-261.
8. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum*; 1986, 29:457-460.
9. Williamson GG and Boyle JA. Antigenic relatedness of small ribonucleoprotein particles. *Biochem Biophys Acta*; 1984, 798:149-155.
10. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol*; 1989, 44:93-151.
11. Jarzabek-Chozelska M et al. Scl-70 antibody - a specific marker of systemic sclerosis. *Br J Dermatol*; 1986, 115:393-401.
12. Kumar V, Beutner EH, Dabski K, Steger R and Koelle M. A standardized method of detecting antibodies to extractable nuclear antigens (RNP and Sm) by gel precipitation. *J Clin Lab Immunol*; 1984, 15:163-166.
13. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories Centers for Disease Control, National Institutes of Health; 1993, (HHS Pub. No{CDC} 93-8395).



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com