

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51
55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0)6131/9258 0
Fax: +49 (0)6131/9258 58
Internet : www.orgentec.com



Instrucciones de uso
Enero 2011



ORG 760-08 / ORG 760-16 Myositis plus

Inmunoblot para la determinación semicuantitativa de autoanticuerpos contra AMA-M2, Jo-1, PM-Scl-100, PL 7, PL 12, Mi-2, Ku (p70/80), SRP, y Rib-P.

Apenas para uso "in vitro"

CONTENIDO DEL KIT

Tamaño del kit	8 o 16 determinaciones
8 o 16	Tiras de nitrocelulosa, con antígenos AMA-M2, Jo-1, PM-Scl-100, PL 7, PL 12, Mi-2, Ku (p70/80), SRP y Rib-P altamente purificados o recombinantes. Listos para el uso.
1 vial, 20 ml	Tampón de muestras (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), amarillo. Listo para el uso
1 vial, 20 ml	Tampón de lavado concentrado (50x)
1 vial, 20 ml	Conjugado (PBS, NaN ₃ <0.1 % (w/w)), (rojo) anticuerpo policlonal contra IgG humana, marcado con fosfatasa alcalina. Listo para el uso
1 or 2 viales, 10 ml	Substrato (BCIP/NBT). Listo para el uso
1 o 2	Tira de nitrocelulosa de calibración (CAL) para la evaluación semicuantitativa. Listo para el uso
1 o 2	Documentation sheet. Listo para el uso
1 o 2	Bandeja de incubación

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos del presente kit están estrictamente dirigidos a su uso in vitro.
2. No intercambiar componentes de kits de diferentes lotes.
3. El test contiene componentes de origen humano, que han resultado negativos para HBsAg y HIV mediante métodos aprobados por la FDA. Ningún test puede sin embargo garantizar la ausencia de HBsAg o HIV, por lo tanto todos los reactivos y derivados de suero humano deben tratarse como material potencialmente capaz de transmitir infecciones.
4. Evitar el contacto con el BCIP/NBT. En caso de entrar en contacto con BCIP/NBT, lavar la zona afectada con agua abundante y jabón.
5. Algunos componentes del kit (Controles, Tampón de muestra, Tampón de lavado) contienen azida sódica como conservante. La Azida sódica (NaN₃) es altamente tóxica y reactiva en forma pura. En las concentraciones en que se encuentra en el producto no puede considerarse peligrosa. A pesar de ello, se recomienda utilizar prácticas de laboratorio prudentes (ver 7.,8.,9.)
6. Algunos componentes del kit contienen Proclin 300 como preservativo. Cuando se desechen los productos conteniendo Proclin 300, dejar correr abundante agua para diluir el componente por debajo de los niveles activos.
7. Utilizar guantes desechables para manejar muestras o reactivos del kit y lavarse las manos cuidadosamente al finalizar.
8. No pipetear con la boca.
9. No comer, beber, fumar o aplicarse maquillaje en áreas donde se manejen muestras o reactivos del kit.

Observe las directrices de control de calidad en laboratorios médicos procesando controles o pool de sueros. Durante el manejo de todos los reactivos del kit, controles y muestras de suero deben observarse las regulaciones legales existentes.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

1. Conservar el kit a 2-8°C.
2. Mantener las tiras selladas en una bolsa con desecantes.
3. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad del kit.
4. No exponer los reactivos al calor, luz solar o a fuentes luminosas intensas, durante su conservación o manejo.
5. El tampón de lavado, una vez diluido es estable durante al menos 30 días, si se conserva a 2-8°C

MATERIAL NECESARIO

Equipamiento

- Pipetas de 10 µl y 1000 µl
- Reloj de laboratorio
- software de tratamiento de datos
- agitador
- pinzas

Preparación de reactivos

- agua destilada o desionizada
- cilindro graduado de 1000 ml

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACION

1. Obtener muestras de sangre total utilizando técnicas médicas aceptadas y evitando la hemólisis.
2. Dejar coagular y separa el suero por centrifugación.
3. El suero debe ser claro y no-hemolizado. Debe evitarse la contaminación por hemólisis o lipemia, aunque no interfieren en el ensayo.
4. Las muestras deben refrigerarse a 2-8°C un máximo de cinco días o guardarse a -20°C hasta seis meses.
5. Evitar congelaciones y descongelaciones de las muestras de suero ya que pueden repercutir en pérdida variable de la actividad de los autoanticuerpos.
6. No es recomendable procesar suero inactivados por calor.

NOTAS TECNICAS

1. No usar los componentes del kit una vez hayan caducado.
2. No intercambiar los componentes del kit de diferentes lotes.
3. Todos los materiales deben estar a temperatura ambiente (20-28°C).
4. Tener todos los reactivos y muestras preparados antes de empezar la técnica. Una vez iniciada, la técnica debe realizarse sin interrupción para obtener resultados más consistentes.
5. Realizar los pasos de la técnica en el orden indicado.
6. Utilizar siempre diluciones de muestra frescas.
7. Evitar contaminaciones cambiando la punta entre muestras y controles de diferentes kits.
8. Las tiras de nitrocelulosa deben manipularse con guantes y pinzas.
9. Todos los tiempos de incubación deben ser medidos cuidadosamente.
10. Sueros control y pools deben ser utilizados en rutina como muestras desconocidas para controlar la actuación de los reactivos y la técnica.
11. Durante la incubación es importante evitar la existencia de burbujas en la tira. Esto podría causar irregularidades en la coloración de las bandas y podría dar lugar a un resultado incorrecto.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial de solución de lavado concentrado (50x) con agua destilada o desionizada hasta un volumen final de 1000 ml antes de su uso. Se puede conservar en refrigerador a 2-8°C durante al menos 30 días después de su preparación o hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

PROCEDIMIENTO

1. Luego introducir las tiras Myositis plus utilizando unas pinzas. Añadir 1.0 ml de tampón de muestras en cada cámara de la bandeja de incubación. Permitir el equilibrio durante 5 minutos mediante agitación.
2. Añadir 10 µl de suero de cada paciente directamente en cada cámara (dilución efectiva 1:101).
3. Incubar durante 60 minutos en agitación a temperatura ambiente.
4. Eliminar completamente el suero diluido de las tiras.
5. Añadir 2.0 ml de tampón de lavado, incubar durante 5 minutos, y eliminar como se indica en el paso 4. Repetir este proceso dos veces.
6. Añadir 1.0 ml de enzima conjugado a cada cámara.
7. Incubar durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente.
8. Eliminar completamente el conjugado diluido de las tiras.
9. Añadir 2.0 ml de tampón de lavado, incubar durante 5 minutos, y eliminar como se indica en el paso 4. Repetir este proceso dos veces.
10. Añadir 1.0 ml de sustrato a cada tira.
11. Incubar durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente.
12. Eliminar el sustrato y lavar las tiras con 1.0 ml agua destilada en tres lavados de 5 minutos cada uno para detener la reacción.
13. Permitir que las tiras se sequen antes de su evaluación.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Control de Calidad

Este test solamente es válido si el control de suero (primera línea), control de conjugado (segunda línea) y control Cut-Off (tercera línea) presentan un cambio con el sustrato. Si no se produce este criterio, el resultado no es válido y el test debe ser repetido.

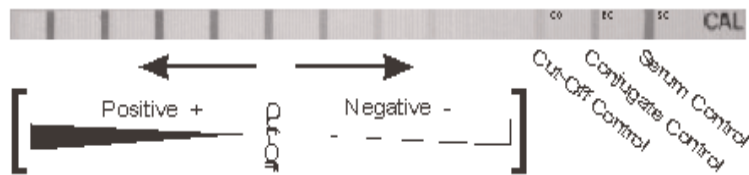
Interpretación de resultados

Los antígenos están recubiertos tal y como se ilustra en la figura.



Las líneas desarrolladas son comparadas con las tiras de calibración:

1. Comparar línea del control Cut-Off de la tira del paciente con las líneas de calibración de la tira de calibración para ajustar.
2. Comparar las líneas del paciente con las líneas de calibración ajustadas al control Cut-off para la determinación semi-cuantitativa.



Notas a la interpretación de los resultados de los pacientes:

1. Ésta es una técnica semicuantitativa para la determinación de la especificidad de autoanticuerpos en suero de pacientes, permitiendo una discriminación entre negativo, dudoso, positivo débil y positivo alto. Las muestras dudosas deben repetirse o testadas con una técnica alternativa.
2. Los sueros de los pacientes en muchas enfermedades autoinmunes reumatológicas a menudo contienen múltiples especificidades de autoanticuerpos. Cada suero individual puede mostrar reacción positiva con más de una línea de antígenos.

- 1 Add **blot strip** into the incubation tray
 Add **1000 µl** sample buffer per strip into the incubation tray
 Shake **5 minutes** while incubating
- 2 Add **10 µl** patient sample and resuspend
 Shake **60 minutes** while incubating
 Discard content and wash 3 times for **5 minutes** with **2000 µl** wash buffer, discard wash
- 3 Add **1000 µl** enzyme conjugate solution per strip
 Shake **30 minutes** while incubating
 Discard content and wash 3 times for **5 minutes** with **2000 µl** wash buffer, discard wash
- 4 Add **1000 µl** substrate per strip
 Shake **10 minutes** while incubating
 Discard content and wash 3 times for **5 minutes** with **1000 µl distilled water**, dry blot strips.
 Read after complete drying, only