



ImmcoStripe™ 68 kD (hsp-70) Antibody Line Immunoassay (LIA)

IVD

PRODUCT INSERT

REF 6001 68 kD (hsp-70) Antibody LIA 20 Determinations

INTENDED USE

A line immunoassay for use in the detection and identification of antibodies to the 68 kD (hsp-70) antigen associated with sensorineural hearing loss (SNHL).

SUMMARY AND EXPLANATION

Hearing loss may be caused by a number of conditions. Certain types of hearing loss can be reversed if diagnosed early and appropriate treatment is instituted. Sensorineural hearing loss (SNHL), commonly referred to as nerve deafness, may be caused by genetic or acquired factors such as infections or can be immunologically mediated. Correct diagnosis of SNHL can be made with the aid of a combination of comprehensive patient history and laboratory studies. In the majority of cases, no cause of SNHL is apparent: such cases are referred to as idiopathic SNHL. A subgroup of idiopathic SNHL cases is treatable with immunosuppressive therapy with gratifying results.^{1,2} The laboratory work up to identify these cases should include serum antibody tests to 68 kD (hsp-70) inner ear antigen.³⁻⁸ Twenty-two percent of patients with bilateral rapidly progressive SNHL and 30% of the patients with Meniere's disease had antibodies that reacted with 68 kD antigen present in the bovine inner ear extracts.⁷ Anti-68 kD (hsp-70) antibodies also occur in approximately 60% of patients with bilateral and 35% of patients with unilateral Meniere's Syndrome and 37% of patients with contralateral delayed endolymphatic hydrops. In situations where corticosteroids are contraindicated, methotrexate or cytoxan treatment can be prescribed.⁹

PRINCIPLES OF PROCEDURE

This line immunoassay uses purified recombinant inducible hsp-70 antigen (rhsp-70) from bovine kidney. The hsp-70 antigen is immobilized onto nitrocellulose membrane strips along with conjugate, serum and cut-off control lines. The serum and conjugate control lines serve as internal procedure controls to verify the addition of serum and conjugate, respectively. The cut-off line provides a colorimetric standard for the evaluation of the reacted hsp-70 test line.

To perform the test, strips are incubated with diluted patient serum. In positive sera, antibodies specifically bind to the rhsp-70 protein on the strip. The strips are washed according to the protocol and the reconstituted conjugate is added to the test strips. After incubation and wash steps, the ready to use substrate is added to the strips. During a 10 minute incubation, conjugate and substrate binding produces visible violet lines for serum, conjugate and cut-off control lines. If the sample is positive for anti-hsp-70 antibodies, the test line will show a reaction more intense than the cut-off line. Reactions are read visually and reported as positive, negative or equivocal (comparable to cut-off line).

Materials Provided

68 kD (hsp-70) Antibody LIA

REF 6001

Kits contains sufficient reagents to perform 20 determinations.

20 x STRIP|HSP70|LIA

Line Immunoassay Test Strips, containing antinuclear antigen coated test lines and control lines. Ready for use.

1 x 120 µl CONTROL|+|HSP70

Positive Control (red cap). Contains human serum positive for antibodies against HSp70 antigen.

1 x 30 ml CONJ|LIA

IgG Conjugate.

1 x 30 ml SUBSTRATE

Enzyme Substrate (amber bottle). Ready for use. **Protect from light**.

1 x 50 ml SAMPLE|DIL










Sample Diluent

1 x 50 ml BUF|WASH|LIA

Wash Buffer Concentrate. Reconstitute to one liter with deionized or distilled water or as needed proportionally.

2 x LIA 10 well Assay Trays

Symbols used on labels:

	Lot number
	Catalog number
	In vitro diagnostic use
	Use by
	Storage temperature
	Consult instructions for use
	Number of tests
	Manufacturer
	Date of Manufacture

Materials Required But Not Provided

- Clean 1.000 ml graduated cylinder
- Non-serrated forceps (Filter forceps)
- Rocker or rotating platform shaker
- Absorbent paper or paper towels
- Deionized or distilled water
- Squeeze bottles to hold diluted wash buffer or distilled water
- Pipettes capable of delivering 10 to 1.000 µl
- Disposable pipette tips
- Timer

REAGENTS**Materials provided**

Store all reagents at 2–8°C; **do not freeze.**

All reagents must be brought to room temperature (18–25°C) and mixed thoroughly prior to use. Do not use if reagent is not clear or if insoluble precipitate is present. After reconstitution, the reagents are stable until the indicated expiry date when stored at 2–8°C and protected from contamination, unless state otherwise below:

- Antigen coated test strips **[STRIP|HSP70|LIA]** are ready for use. Please allow the test strip bag to reach the room temperature before opening to avoid condensation and associated deterioration. Please re-pack unused test strips and store at 2–8°C in dark and dry conditions.
- **Sample Diluent** is ready to use **[SAMPLE|DIL]** is stable for at least 8 weeks when stored properly and protected from microbial or chemical contamination.
- Reconstitute 1 part **[BUF|WASH|LIA]** into 19 parts of distilled or deionized water to result in 1 liter of **Wash Buffer**. Wash Buffer is stable for at least 8 weeks after reconstitution when stored properly and protected from microbial contamination.
- **[CONJ|LIA]** and **[SUBSTRATE]** are stable for at least 8 weeks after opening when stored properly and protected from microbial contamination. **[SUBSTRATE]** is light sensitive and must be stored in the provided amber colored bottle.

Antigen strips can only be used once. Do not interchange components of different lots. Do not use reagents beyond expiration date indicated on labels.

Precautions

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 the above materials.¹⁰

WARNING – Proclin 300 is a preservative. Upon disposal of liquids containing Proclin 300, flush with large volumes of water to dilute the components below active levels.

EN

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. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Specimens with gross hemolysis, elevated lipids or microbial contamination may interfere with the performance of the test and therefore must not be used. Store specimens at 2–8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. It is recommended that frozen specimens be tested within one year. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Procedural Notes

- Read Product Insert carefully before starting with the assay.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate to room temperature for approximately 30 minutes prior to starting the test procedure. Return all unused specimens and reagents to the refrigerator promptly after use.
- Proper washing technique is critical to the satisfactory performance of the assay.
- Manipulate test strips with clean forceps or gloves only. Avoid touching the white nitrocellulose areas.
- The test lines are placed above (refer to Figure 1 Schematic) the cut-off, serum and conjugate control lines as described in the schematic. Serum and conjugate control lines appear on the same piece of nitrocellulose at the bottom.
- Assign specimen identification numbers to the respective strips on the Report Form. Each strip has strip number and lot number printed on the bottom for traceability.
- Complete all other relevant information on the Report Form prior to starting the assay.

Test Method

- Step 1** Using gloves or blunt forceps, peel off the required number of strips. Care should be taken not to touch the nitrocellulose coated areas with bare hands or pointed forceps.
- Step 2** Place required number of strips **STRIP|HSP70|LIA** labeled side up into individual wells of the assay tray.
- Step 3** Pipet 1.5 ml of Sample Diluent **SAMPLE|DIL** into each well making sure that the strips are completely submerged under the liquid.
- Step 4** Incubate the strips in Sample Diluent **SAMPLE|DIL** for at least 10 minutes. The blue tracking line starts to disappear as the membrane is soaked.
- Step 5** Pipet 15 µl of serum or control sample into appropriate wells to obtain a 1:101 dilution. Incubate 60 minutes (±5 min.) at room temperature on a rocker or rotating shaker.
- Step 6** WASH: Aspirate sample solution into waste container. Thoroughly wash strips with Wash Buffer **BUF|WASH|LIA** by squirting approximately 2 ml of solution directly onto strips. Wash strips with gentle agitation for 5 minutes and aspirate solution into waste container. Repeat the wash two more times. Caution: Complete washing of the strips between incubations is crucial to obtain valid results. Improper washing will result in high background staining. Do not allow the strips to become dry at any step during the assay.
- Step 7** Pipet 1.0 ml of conjugate **CONJ|LIA** into each well. Incubate 30 minutes (±5 min) at room temperature on rocker or rotating shaker.
- Step 8** Repeat Step 6.
- Step 9** Pipet 1.0 ml **SUBSTRATE** into each well and incubate with gentle shaking 10 minutes at room temperature and reduced light. The serum and conjugate control lines develop intense color after incubation in substrate. Cut-off control line develops into a negative to faintly colored line after the incubation.
- Step 10** To stop the reaction, rinse strips 2x with distilled/deionized water by squirting approximately 2 ml of water directly onto strips followed by aspiration. Do not soak/wash for more than 10 minutes as this may result in decreased sensitivity of the developed colored lines.
- Step 11** Using blunt forceps remove strips from assay tray and place them gently onto absorbent paper and allow them to dry. Let the strips dry before analysis or affixing them on the report/scoring sheet.

EN Quality Control

Procedural Controls: Each strip has three procedural controls for the addition of serum and conjugate and a cut-off line for determining the weak or negative reactions.

Positive and Negative controls are available as optional components and may be run for additional quality control. Individual labs are expected to optimize the substrate development time by +/- 2 minutes based on the blot processor or methods that they use. It is suggested that the cut-off line should be faintly visible line post incubations with substrate. An invisible or too a strong cut-off line suggests optimization of the substrate development time for the given run conditions.

Interpretation

The test strips contain control lines at the bottom and test line above the controls. The bottom end of the test strip (near serial number) has three control lines: the cut-off line, the serum control line and the conjugate control line from top to bottom. The cut-off allows the technician to determine the test result as positive, negative or indeterminate (+/-). The two procedure control lines ensure the addition of specimen, conjugate and substrate.

Compare the reaction of test line with those of the controls. Use of a magnifying glass can assist in observation of weak reactions.

- As labeled in Figure 1, the serum and conjugate control lines should be clearly positive indicating a successful experiment. The cut-off is a faint line with variation in intensity based on the experimental conditions. The schematic in Figure 1 shows an example test line and 3 control lines. The test line development depends on the sample. Positive reactions can occur in varying intensities from weak to strong. **Weak reactions should be compared with intensity of the provided cut-off line within the strip.** Reactions that are distinctly darker or denser than the intensity of the cut-off line should be considered positive.
- Strips may show a homogeneous or discolored background due to various interfering factors in lipemic or hemolytic sera. This effect can also be seen if the test strips are not sufficiently blocked or accidentally allowed to dry up during the assay.
- In case of weak positive and negative reactions, the reacted line intensity should be compared to cut-off line to determine the result as negative (weaker intensity than the cut-off line) or equivocal (+/-). Indistinguishable from cut-off line).
- Dried strips can be assembled in the provided report/scoring sheet. The plastic protective flap is permanently affixed to the report sheet on the left edge. Carefully peel the plastic flap in the right to left direction like a page of the book. Place the reacted strips on the adhesive tape in the respective slot and cover the plastic flap back in place. The protective plastic flap is designed to be reusable for multiple sessions of experiments and the strips can be assembled in respective slots. The technician can use the form to record the lot numbers of used reagents, specimen number and results/comments.

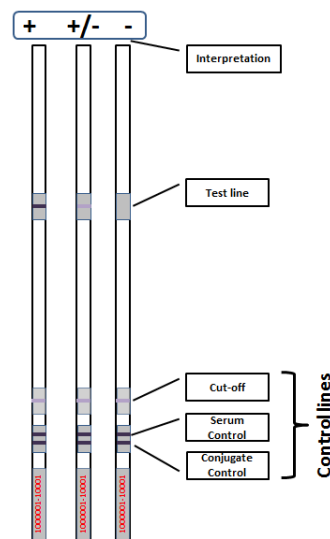


Figure 1: Schematic of reacted LIA strips with one test line.

Figure 2: Schematic of Report Sheet

LIMITATIONS OF PROCEDURE

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. Do not store specimen at 2–8°C more than a week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

The 68 kD (hsp-70) Antibody Line Immunoassay should be used as an aid to diagnosis. Positive results may be found in other autoimmune conditions or certain infectious diseases. Hence results should be evaluated and interpreted by a medical authority in light of the patient's clinical history and other laboratory findings. Some sera may react to the MW marker occasionally, the significance of which is not known.

EXPECTED VALUES

Antibodies to 68 kD (hsp-70) occur in patients with active idiopathic SNHL and antibody titers are shown to correlate with disease activity.

EN**Anti-68 kD (hsp-70) Antibodies in Patients with Idiopathic Bilateral SNHL¹¹**

Disease Group	No. Tested	No. Positive	% Positive
IPBSNHL	72	42	58
Otosclerosis	11	0	0
Cogan's Syndrome	8	0	0
Normals	53	1	2

Correlation of Anti-68 kD (hsp-70) Antibody Reactivity to Disease Activity¹¹

Disease Activity	Anti-68 kD Antibody
Active	89%
Inactive	0%

One third-party study of 34 patients with rapidly progressive hearing loss demonstrated that anti-rhsp-70 OTOBlot had 42% sensitivity, 90% specificity, and 91% positive predictive value for predicting steroid responsiveness.¹²

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the ImmuStripe™ 68 kD (hsp-70) Antibody Line Immunoassay was evaluated by testing well-characterized specimens from SNHL patients, idiopathic hearing loss patients, disease controls and “normal” human sera. These results are summarized below.

		Clinical Status		
		Positive	Negative	Total
68 kD	Positive	36	2	38
(hsp-70)	Negative*	14	79	93
LIA	Total	50	81	131

Sensitivity: 72.0%

Specificity: 97.5%

Clinical Agreement: 87.8%

* Indeterminate samples were considered negative.

SNHL/Idiopathic Hearing Loss Subjects: 50

Disease Controls: 33

Healthy Normal Subjects: 48

Reproducibility

Assays of samples in the negative range, equivocal and positive range were performed to determine qualitative reproducibility from run to run and operator to operator. Results produced 100% qualitative agreement.

Cross Reactivity

Autoimmune disease controls were reacted to test potential cross-reactivity of the assays, including the following patient populations: celiac disease (5), extractable nuclear antigen antibody positive connective disease (12), Hashimoto's thyroiditis (6), rheumatoid arthritis (5), and systemic lupus erythematosus (5). One rheumatoid arthritis specimen was positive yielding a 3.3% positive rate in this population.

Interference

Interference was studied by mixing sera with known 68 kD (hsp-70) antibody results with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. No significant interference impacting qualitative results was demonstrated for the following substances at the levels indicated: hemoglobin (2 g/L), bilirubin (342 µmol/L), triglycerides (25 mg/ml) and Rheumatoid Factor (100 EU/ml).

ImmcoStripe™ 68 kD (hsp-70) Αντίσωμα Ανοσοδοκιμασία Γραμμής (LIA)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 6001 68 kD (hsp-70) Αντίσωμα LIA

20 Προσδιορισμοί

ΣΚΟΠΟΥΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Ανοσοδοκιμασία γραμμής για χρήση στην ανίχνευση και τον προσδιορισμό αντισωμάτων στο αντιγόνο 68 kD (hsp-70) που συνδέεται με νευροαισθητήρια απώλεια ακοής (SNHL).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Απώλεια ακοής μπορεί να προκληθεί από διάφορες συνθήκες. Ορισμένοι τύποι απώλειας ακοής μπορεί να αναστραφούν με πρώιμη διάγνωση και έναρξη της κατάλληλης αντιμετώπισης. Η νευροαισθητήρια απώλεια ακοής (SNHL), συχνά αναφερόμενη ως κώφωση λόγω βλάβης του ακουστικού νεύρου, μπορεί να προκληθεί από γενετικούς ή επίκτητους παράγοντες όπως μολύνσεις ή μπορεί να έχει ανοσολογικά αίτια. Σωστή διάγνωση της SNHL μπορεί να γίνει με τη βοήθεια συνδυασμού πλήρους ιστορικού του ασθενούς και εργαστηριακών μελετών. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, δεν είναι εμφανής καμία αιτία SNHL: αυτές οι περιπτώσεις αναφέρονται ως ιδιοπαθής SNHL. Υπο-ομάδα περιπτώσεων ιδιοπαθούς SNHL αντιμετωπίζεται με ανοσοκατασταλτική αγωγή με ικανοποιητικά αποτελέσματα.^{1,2} Η εργαστηριακή εργασία για τον προσδιορισμό αυτών των περιπτώσεων θα πρέπει να περιλαμβάνει δοκιμές αντισωμάτων ορού σε αντιγόνο 68 kD (hsp-70) έως ωτός.³⁻⁸ Είκοσι δύο τοις εκατό των ασθενών με αμφίπλευρη ραγδαίως εξελισσόμενη SNHL και 30% των ασθενών με νόσο Meniere είχαν αντισώματα που αντέδρασαν με 68 kD αντιγόνο παρόν στα εκχυλίσματα έσω ωτός βοοειδών.⁷ Αντισώματα κατά του 68 kD (hsp-70) μπορούν επίσης να εμφανισθούν σε περίπου 60% των ασθενών με αμφίπλευρο και 35% των ασθενών με μονόπλευρο Σύνδρομο Meniere και 37% των ασθενών με αντίπλευρο καθυστερούμενο ενδολεμφικό υδρωπια. Σε περιπτώσεις όπου αντενδείκνυνται τα κορτικοστεροειδή, μπορεί να συνταγογραφηθεί αγωγή με μεθοτρεξάτη ή κυτοζάνη.⁹

ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η παρούσα ανοσοδοκιμασία γραμμής χρησιμοποιεί καθαρό ανασυνδυασμένο επαγωγίμο αντιγόνο hsp-70 (rhsp-70) από βόειο νεφρό. Το αντιγόνο hsp-70 ακινητοποιείται σε ταινίες μεμβράνης νιτροκυταρίνης με γραμμές ελέγχου συζεύγματος (conjugate), ορού και αποκοπής ελέγχου (cut-off control lines). Οι γραμμές ελέγχου ορού και συζεύγματος λειτουργούν ως εσωτερικοί έλεγχοι της διαδικασίας για να εξακριβωθεί η προσθήκη ορού και συζεύγματος αντίστοιχα. Η γραμμή αποκοπής παρέχει χρωματομετρικό πρότυπο για την αξιολόγηση της αντιδρώσας γραμμής δοκιμής hsp-70.

Για την εκτέλεση της δοκιμής, οι ταινίες εμβυθίζονται σε αραιωμένο ορό ασθενών. Σε θετικούς ορούς, τα αντισώματα δεσμεύονται ειδικά στην πρωτεΐνη rhsp-70 που βρίσκεται επάνω στην ταινία. Οι ταινίες πλένονται σύμφωνα με το πρωτόκολλο και το ανασυσταθέν σύζευγμα προστίθεται στις ταινίες δοκιμής. Μετά τα βήματα επώασης και πλύσης, το έτοιμο προς χρήση υπόστρωμα προστίθεται στις ταινίες. Κατά τη διάρκεια 10 λεπτής επώασης, η δέσμευση συζεύγματος και υποστρώματος παράγει ορατές ιώδεις γραμμές για τις γραμμές ελέγχου ορού, συζεύγματος και αποκοπής. Εάν το δείγμα είναι θετικό για αντισώματα κατά hsp-70, η γραμμή δοκιμής θα δείξει αντίδραση εντονότερη από την γραμμή αποκοπής. Οι αντιδράσεις διαβάζονται οπτικά και αναφέρονται ως θετικές, αρνητικές ή αμφίσημες (σε σύγκριση με τη γραμμή αποκοπής).

Παρεχόμενα Υλικά

68 kD (hsp-70) Αντίσωμα LIA

REF 6001

Τα περιεχόμενα επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 20 προσδιορισμών.

20 x STRIP|HSP70|LIA

Ταινίες Ανοσοδοκιμασίας Γραμμής, που περιέχουν γραμμές δοκιμής και γραμμές ελέγχου επικαλυμμένες με αντιπυρηνικό αντίγονο. Έτοιμες προς χρήση.

1 x 120 μl CONTROL+|HSP70

Θετικός Έλεγχος (κόκκινο πύμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα κατά αντιγόνου HSp70.

EL

1 x 30 ml	CONJ LIA
1 x 30 ml	SUBSTRATE
1 x 50 ml	SAMPLE DIL
1 x 50 ml	BUF WASH LIA
2 x	
1 x	

Σύζευγμα IgG.

Ενζυμικό υπόστρωμα (κεχριμπαρένια φιάλη). Έτοιμο προς χρήση. **Προστατέψτε από το φως.**







Διάλυμα αραιώσης/εμπλοκής

Συμπύκνωμα Διαλύματος Πλύσης. Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο με απιοντισμένο ή αποσταγμένο νερό ή όπως απαιτείται αναλογικά.

LIA 10 εσχάρες δοκιμασίας με σπές

Δελτίο Αναφοράς/Βαθμολόγησης

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT	Αριθμός Παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
IVD	Διαγνωστική χρήση in vitro
	Χρήση έως
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Αριθμός δοκιμών
	Κατασκευαστής
	Ημερομηνία κατασκευής

Απαιτούμενα, Μη Παρεχόμενα Υλικά

- Καθαρός ογκομετρικός κύλινδρος 1.000 ml
- Μη οδοντωτή λαβίδα (λαβίδα φίλτρου)
- Αναδευτήρας ή δοχείο περιστροφικής πλατφόρμας
- Απορροφητικό χαρτί ή χαρτοπετσέτες
- Απιοντισμένο ή αποσταγμένο νερό
- Εύκαμπτα πλαστικά μπουκάλια για το αραιωμένο διάλυμα πλύσης ή το αποσταγμένο νερό
- Πιπέτες ικανές να απελευθερώνουν 10 έως 1.000 μl
- Ρύγχη πιπετών μιας χρήσης
- Χρονόμετρο

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**Αποθήκευση και Προετοιμασία**

Αποθηκεύστε όλα τα αντιδραστήρια στους 2–8°C. **Μην καταψύχετε.**

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (18–25°C) και να αναμειχθούν επιμελώς πριν από τη χρήση. Μη χρησιμοποιείτε εάν το αντιδραστήριο δεν είναι καθαρό ή εάν υπάρχει αδιάλυτο ίζημα. Μετά την ανασύσταση, τα αντιδραστήρια παραμένουν σταθερά έως την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης εφόσον αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2–8°C και προστατεύονται από τις μολύνσεις, εκτός από τις κάτωθι περιπτώσεις:

- Οι επικαλυμμένες με αντιγόνο ταινίες δοκιμής **STRIP|HSP70|LIA** είναι έτοιμες για χρήση. Αφήστε τη σακούλα με τις ταινίες δοκιμής να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου προτού την ανοίξετε, αποφεύγοντας την υγρασία της συμπύκνωσης και τη σχετική επιδείνωση. Τοποθετήστε εκ νέου στη συσκευασία ταινίες δοκιμής που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί και αποθηκεύστε τις σε θερμοκρασία 2–8°C σε ξηρό και σκοτεινό μέρος.
- Το **Δείγμα Διαλύματος Αραιώσης** είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί **SAMPLE|DIL**. Το διάλυμα αραιώσης παραμένει σταθερό για τουλάχιστον 8 εβδομάδες εφόσον αποθηκεύεται σωστά και προστατεύεται από τις μικροβιακές ή χημικές μολύνσεις.
- Ανασυνθέστε 1 μέρος **BUF|WASH|LIA** σε 19 μέρη αποσταγμένου ή απιοντισμένου νερού για να δημιουργήσετε 1 λίτρο **Διαλύματος Πλύσης**. Το διάλυμα αυτό παραμένει σταθερό τουλάχιστον για 8 εβδομάδες μετά την ανασύσταση του εφόσον αποθηκεύεται σωστά και προστατεύεται από τις μικροβιακές μολύνσεις.
- Το **CONJ|LIA** και το **SUBSTRATE** παραμένουν σταθερά τουλάχιστον για 8 εβδομάδες μετά το άνοιγμα εφόσον αποθηκεύονται σωστά και προστατεύονται από τις μικροβιακές μολύνσεις. Το **SUBSTRATE** είναι ευαίσθητο στο φως και πρέπει να αποθηκεύεται στην κεχριμπαρένια φιάλη η οποία παρέχεται.

EL

Οι ταινίες αντιγόνου είναι μίας χρήσης. Μη χρησιμοποιείτε συστατικά μέρη από διαφορετικές παρτίδες. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

Προφυλάξεις

Όλα τα προερχόμενα από τον άνθρωπο συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν έχουν ελεγχθεί για HBsAg, HCV, HIV-1 και 2 και HTLV-I και βρέθηκαν αρνητικά σύμφωνα με ελέγχους που απαιτούνται από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Ωστόσο, παράγωγα ανθρώπινου αίματος και δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά. Τηρείτε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για την αποθήκευση, χορήγηση και διάθεση των παραπώνων υλικών.¹⁰

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το Proclin 300 είναι συντηρητικό. Κατά τη διάθεση των υγρών που περιέχουν Proclin 300, απορρίψτε με μεγάλη ποσότητα νερού για να επιτύχετε διάλυση των συστατικών κάτω από τα επίπεδα δραστηριότητας.

Οι οδηγίες θα πρέπει να τηρούνται ακριβώς όπως εμφανίζονται στο ένθετο του παρόντος κιτ για να διασφαλιστούν έγκυρα αποτελέσματα. Μην ανταλλάσσετε στοιχεία του κιτ με στοιχεία από άλλες πηγές. Τηρήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιήσετε τη μικροβιακή και διασταυρούμενη μόλυνση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιείτε. Μην χρησιμοποιείτε στοιχεία του κιτ μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Σε αυτή τη διαδικασία θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού. Δείγματα με σοβαρή αιμόλυση, υψηλά λιπίδια ή μικροβιακή μόλυνση ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της δοκιμής και συνεπώς δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Αποθηκεύστε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2–8°C για διάστημα όχι μεγαλύτερο της μίας εβδομάδας. Για μεγαλύτερης διάρκειας αποθήκευση, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Συνιστάται τα κατεψυγμένα δείγματα να ελέγχονται εντός ενός έτους. Αποφύγετε την επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Διαδικαστικές Σημειώσεις

- Διαβάστε προσεκτικά το ένθετο του προϊόντος πριν ξεκινήσετε τη δοκιμασία.
- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια των δοκιμών να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 λεπτά πριν από την έναρξη της διαδικασίας της δοκιμής. Τοποθετήστε όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια που δεν χρησιμοποιήσατε στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση.
- Η τεχνική της καλής πλύσης είναι πολύ σημαντική για την ικανοποιητική εκτέλεση της δοκιμασίας.
- Χρησιμοποιήστε καθαρή λαβίδα ή γάντια για να αγγίξετε τις ταινίες δοκιμής. Αποφύγετε να αγγίζετε τα λευκά σημεία με τη νιτροκυτταρίνη.
- Οι γραμμές δοκιμής βρίσκονται πάνω από (δες Απεικόνιση στο Σχήμα 1) τις γραμμές ελέγχου αποκοπής, ορού και συζεύγματος όπως περιγράφεται στο σχήμα. Οι γραμμές ελέγχου του ορού και του συζεύγματος εμφανίζονται στο ίδιο κομμάτι νιτροκυτταρίνης στο κάτω μέρος.
- Γράψτε αναγνωριστικούς αριθμούς δειγμάτων στις αντίστοιχες ταινίες στο Έντυπο Αναφοράς. Κάθε ταινία αναγράφει τον αριθμό της ταινίας και τον αριθμό της παρτίδας στο κάτω μέρος για να μπορεί να αναγνωρισθεί.
- Συμπληρώστε όλες τις σχετικές πληροφορίες στο Έντυπο Αναφοράς προτού ξεκινήσετε τη δοκιμασία.

Μέθοδος Δοκιμής

- Βήμα 1** Χρησιμοποιώντας γάντια ή λαβίδα με στρογγυλεμένο άκρο, αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών. Προσέξτε να μην αγγίζετε με γυμνά χέρια ή με αιχμηρή λαβίδα τα σημεία τα οποία είναι επικαλυμμένα με νιτροκυτταρίνη.
- Βήμα 2** Τοποθετήστε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών **STRIP|HSP70|LIA** με την πλευρά της ετικέτας προς τα επάνω στις μεμονωμένες οπές της εσχάρας δοκιμασίας.
- Βήμα 3** Χρησιμοποιώντας την πιπέτα, κάντε έγχυση 1,5 ml από το Διάλυμα Αραίωσης **SAMPLE|DIL** σε κάθε οπή και βεβαιωθείτε ότι οι ταινίες βυθίζονται πλήρως στο υγρό.
- Βήμα 4** Επώαστε τις ταινίες στο Διάλυμα Αραίωσης **SAMPLE|DIL** για τουλάχιστον 10 λεπτά. Η γαλάζια γραμμή εντοπισμού αρχίζει να εξαφανίζεται καθώς η μεμβράνη υγραίνεται.
- Βήμα 5** Χρησιμοποιώντας την πιπέτα, κάντε έγχυση 15 μl ορού ή δείγματος ελέγχου στις κατάλληλες οπές για να αποκτήσετε διάλυμα 1:101. Επώαστε για 60 λεπτά (±5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου πάνω σε αναδευτήρα ή περιστρεφόμενο δοχείο.
- Βήμα 6** ΠΛΥΝΕΤΕ: Αναρροφήστε το δείγμα του διαλύματος στο δοχείο απορριμμάτων. Πλύνετε επιμελώς τις ταινίες με Διάλυμα Πλύσης **BUF|WASH|LIA**, ρίχνοντας περίπου 2ml διαλύματος απευθείας πάνω στις ταινίες. Πλύνετε τις ταινίες ανακινώντας ελαφρά για 5 λεπτά και αναρροφήστε το διάλυμα στο δοχείο

των απορριμμάτων. Επαναλάβετε την πλύση δύο ακόμα φορές. Προσοχή: Είναι σημαντικό να πλένονται πλήρως οι ταινίες μεταξύ των επωάσεων προκειμένου τα αποτελέσματα σας να είναι έγκυρα. Μη κατάλληλη πλύση θα έχει ως αποτέλεσμα υψηλή χρώση υποβάθρου. Μην αφήνετε τις ταινίες να στεγνώσουν σε οποιοδήποτε στάδιο κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.

Βήμα 7 Χρησιμοποιώντας την πιπέτα, κάντε έγχυση 1,0 ml συζεύγματος **CONJ/LIA** σε κάθε οπή. Επώαστε για 30 λεπτά (±5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου στον αναδευτήρα ή το περιστρεφόμενο δοχείο.

Βήμα 8 Επαναλάβετε το Βήμα 6.

Βήμα 9 Χρησιμοποιώντας την πιπέτα, κάντε έγχυση 1,0 ml **SUBSTRATE** σε κάθε οπή και επώαστε, ανακινώντας ελαφρά 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και με χαμηλό φωτισμό. Οι γραμμές ελέγχου του ορού και του συζεύγματος αναπτύσσονται έντονο χρώμα μετά την επώαση στο υπόστρωμα. Η γραμμή ελέγχου αποκοπής εξελίσσεται σε αρνητική έως ελαφρά χρωματιστή γραμμή μετά την επώαση.

Βήμα 10 Για να σταματήσετε την αντίδραση, ξεπλύνετε τις ταινίες 2x με αποσταγμένο/απιοντισμένο νερό, ρίχνοντας περίπου 2ml νερού απευθείας πάνω στις ταινίες και στη συνέχεια αναροφώντας. Μην εμβυθίζετε/πλένετε για περισσότερο από 10 λεπτά, καθώς αυτό ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ευαισθησία των χρωματιστών γραμμών που αναπτύσσονται.

Βήμα 11 Χρησιμοποιώντας λαβίδα με στρογγυλεμένο άκρο, αφαιρέστε τις ταινίες από την εσχάρα δοκιμασίας και τοποθετήστε τις απαλά σε απορροφητικό χαρτί, αφήνοντας τις να στεγνώσουν. Αφήστε τις ταινίες να στεγνώσουν πριν από την ανάλυση ή προτού τις κολλήσετε στο δελτίο αναφοράς/βαθμολόγησης.

Ποιοτικός Έλεγχος

Διαδικαστικοί Έλεγχοι: Κάθε ταινία έχει τρεις διαδικαστικούς ελέγχους για την προσθήκη ορού και συζεύγματος και μία γραμμή αποκοπής για τον καθορισμό των ασθενών ή αρνητικών αντιδράσεων.

Θετικοί και Αρνητικοί έλεγχοι είναι διαθέσιμοι ως προαιρετικά συστατικά στοιχεία και μπορούν να διεξαχθούν για πρόσθετο ποιοτικό έλεγχο.

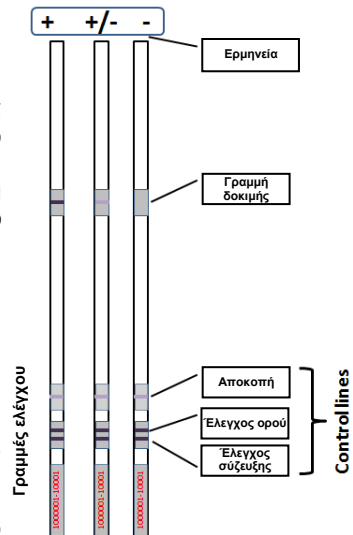
Μεμονωμένα εργαστήρια αναμένεται να βελτιστοποιήσουν το χρόνο ανάπτυξης του υποστρώματος κατά +/-2 λεπτά με βάση τον επεξεργαστή αποτυπώματος ή μεθόδους που χρησιμοποιούν. Συνιστάται η γραμμή αποκοπής να είναι ελαφρώς ορατή μετά τις επωάσεις με το υπόστρωμα. Αόρατη ή πολύ έντονη γραμμή αποκοπής υποδεικνύει βελτιστοποίηση του χρόνου ανάπτυξης υποστρώματος για τις δεδομένες συνθήκες διεξαγωγής της δοκιμασίας.

Ερμηνεία

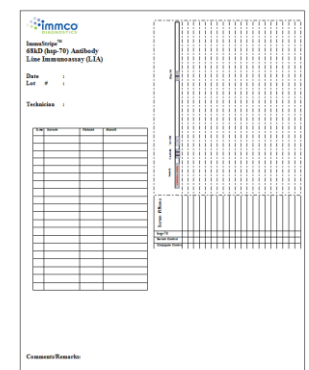
Οι ταινίες δοκιμής περιέχουν γραμμές ελέγχου στο κάτω μέρος και γραμμή δοκιμής πάνω από τους ελέγχους. Το κάτω μέρος της ταινίας δοκιμής (κοντά στο σειριακό αριθμό) έχει τρεις γραμμές ελέγχου: τη γραμμή αποκοπής, τη γραμμή ελέγχου ορού και τη γραμμή ελέγχου συζεύγματος από πάνω προς τα κάτω. Η αποκοπή επιτρέπει στον τεχνικό να καθορίσει το αποτέλεσμα της δοκιμής ως θετικό, αρνητικό ή αμφίσημο (+/-). Οι δύο γραμμές ελέγχου της διαδικασίας διασφαλίζουν την προσθήκη δείγματος, συζεύγματος και υποστρώματος.

Συγκρίνετε την αντίδραση της γραμμής δοκιμής με εκείνες των ελέγχων. Η χρήση μεγεθυντικού φακού μπορεί να βοηθήσει στην παρατήρηση ασθενών αντιδράσεων.

- Όπως αναγράφεται στην ετικέτα του Σχήματος 1, οι γραμμές ελέγχου του ορού και του συζεύγματος θα πρέπει να είναι εμφανώς θετικές, δείχνοντας την επιτυχία του πειράματος. Η αποκοπή είναι μια απαλή γραμμή με διακυμάνσεις έντασης ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος. Η απεικόνιση στο Σχήμα 1 δείχνει ένα παράδειγμα γραμμής δοκιμής και 3 γραμμών ελέγχου. Η ανάπτυξη της γραμμής δοκιμής εξαρτάται από το δείγμα. Θετικές αντιδράσεις μπορεί να υπάρχουν με διαφορετικές εντάσεις, από ασθενείς έως έντονες. **Ασθενείς αντιδράσεις θα πρέπει να συγκριθούν με την ένταση της παρεχόμενης γραμμής αποκοπής εντός της ταινίας.** Αντιδράσεις οι οποίες είναι εμφανώς πιο σκούρες ή πυκνές από την ένταση της γραμμής αποκοπής θα πρέπει να θεωρούνται θετικές.
- Οι ταινίες ενδέχεται να παρουσιάζουν ομοιόμορφο ή αποχρωματισμένο φόντο λόγω των διαφόρων παραγόντων επιρροής στο λιπαιμικό ή αιμολυτικό ορό. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί επίσης να παρουσιαστεί εάν οι ταινίες δοκιμής δεν έχουν επαρκές διάλυμα εμπλοκής ή αφεθούν κατά λάθος να στεγνώσουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.
- Σε περίπτωση ασθενών θετικών και αρνητικών αντιδράσεων, η ένταση της αντιδρώσας γραμμής θα πρέπει να συγκρίνεται με τη γραμμή αποκοπής για να καθοριστεί εάν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό (ασθενέστερη ένταση από την γραμμή διαχωρισμού) ή αμφίσημο (+/-). Απροσδιόριστο από τη γραμμή αποκοπής).



Εικόνα 1: Σχηματικό διάγραμμα λωρίδων LIA αντιδρώσων με μία γραμμή δοκιμής.



Εικόνα 2: Σχηματικό διάγραμμα Φύλλου Αναφοράς

EL

- Οι ταινίες που έχουν στεγνώσει μπορούν να συγκεντρωθούν στο παρεχόμενο δελτίο αναφοράς/βαθμολόγησης. Το πλαστικό προστατευτικό κάλυμμα προσαρτάται μόνιμα στο δελτίο αναφοράς στο αριστερό άκρο. Αφαιρέστε προσεκτικά το πλαστικό κάλυμμα με κατεύθυνση από δεξιά προς τα αριστερά όπως τη σελίδα ενός βιβλίου. Τοποθετήστε τις ταινίες που έχουν αντιδράσει επάνω στην κολλητική ταινία στην αντίστοιχη εσοχή και κλείστε, τοποθετώντας το πλαστικό κάλυμμα πάλι στη θέση του. Το προστατευτικό πλαστικό κάλυμμα είναι σχεδιασμένο για πολλαπλές χρήσεις για πολλαπλά πειράματα και οι ταινίες μπορούν να συγκεντρωθούν στις αντίστοιχες εσοχές. Ο τεχνικός μπορεί να χρησιμοποιήσει το έντυπο για να καταγράψει τους αριθμούς παρτίδας των χρησιμοποιημένων αντιδραστηρίων, τον αριθμό δείγματος και αποτελέσματα/σχόλια.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Μόνο δείγματα ορού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στην παρούσα διαδικασία. Σοβαρά αιμολυμένα, λιπαιμικά ή βακτηριδιακά επιμολυσμένα δείγματα ενδέχεται να επηρεάσουν την εκτέλεση της δοκιμής και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα δεν θα πρέπει να φυλάσσονται για διάστημα μεγαλύτερο της μίας εβδομάδας στους 2–8°C. Για αποθήκευση μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγετε την επανειλημμένη απόψυξη και νέα ψύξη των δειγμάτων.

Η Ανοσοδοκιμασία Γραμμής με 68 kD (hsp-70) Αντίσωμα θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως βοήθημα για τη διάγνωση. Θετικά αποτελέσματα ενδέχεται να βρεθούν σε άλλες αυτοάνοσες παθήσεις ή σε ορισμένες λοιμώδεις ασθένειες. Συνεπώς, τα αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογούνται και να ερμηνεύονται από ιατρική αρχή υπό το φως του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων εργαστηριακών ευρημάτων. Ορισμένοι οροί ενδέχεται να αντιδράσουν περιστασιακά στο δείκτη MW, ενώ η σημασία του γεγονότος αυτού παραμένει άγνωστη.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Αντισώματα σε 68 kD (hsp-70) εμφανίζονται σε ασθενείς με ενεργή ιδιοπαθή SNHL (νευροαισθητήρια απώλεια ακοής) και οι τίτλοι αντισωμάτων εμφανίζονται να συσχετίζονται με τη δραστηριότητα της νόσου.

Αντισώματα κατά 68 kD (hsp-70) σε Ασθενείς με Ιδιοπαθή Αμφίπλευρη SNHL¹¹

Ομάδα Νόσου	Αρ. Ελεγμένων	Αρ. Θετικών	% Θετικό
IPBSNHL	72	42	58
Ωτοσκλήρυνση	11	0	0
Σύνδρομο Cogan	8	0	0
Φυσιολογικοί	53	1	2

Συσχετισμός Αντιδραστικότητας Αντισώματος κατά 68 kD (hsp-70) στη Δραστηριότητα της Νόσου¹¹

Δραστηριότητα Νόσου	Αντίσωμα κατά 68 kD
Ενεργή	89%
Ανενεργή	0%

Μελέτη του ενός τρίτου 34 ασθενών με ραγδαίως εξελισσόμενη απώλεια ακοής έδειξε ότι τα anti-rhsp-70 OTOBlot είχαν 42% ευαισθησία, 90% ειδικότητα, και 91% θετική αναμενόμενη τιμή για πρόβλεψη αποκρισιμότητας σε στεροειδή.¹²

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα της ImmuStripe™ 68 kD (hsp-70) Antibody Line Immunoassay αξιολογήθηκε με δοκιμή καλώς χαρακτηρισμένων δειγμάτων από ασθενείς με νευροαισθητήρια απώλεια ακοής, ασθενείς με ιδιοπαθή απώλεια ακοής, ελέγχους νόσων και «φυσιολογικούς» ανθρώπινους ορούς. Αυτά τα αποτελέσματα συνοψίζονται κατωτέρω.

		Κλινική Κατάσταση		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
68 kD	Θετικό	36	2	38
(hsp-70)	Αρνητικό *	14	79	93
LIA	Σύνολο	50	81	131
Ευαισθησία:		72,0%		
Ειδικότητα:		97,5%		
Κλινική Συμφωνία:		87,8%		

* Τα απροσδιόριστα δείγματα θεωρήθηκαν αρνητικά.

Νευροαισθητήρια απώλεια ακοής /Ιδιοπαθής απώλεια ακοής: 50

Έλεγχοι Νόσων: 33

Υγιή Συνήθη Υποκείμενα: 48

Αναπαραγωγιμότητα

Δοκιμασίες δειγμάτων στο αρνητικό, το αμφίσημο και το θετικό εύρος εκτελέστηκαν για να προσδιορίσουν ποιοτική αναπαραγωγιμότητα από εκτέλεση σε εκτέλεση και από χειριστή σε χειριστή. Τα αποτελέσματα παρήγαγαν 100% ποιοτική συμφωνία.

Διασταυρούμενη Αντιδραστικότητα

Έλεγχοι αυτοάνοσων νοσημάτων εξετάστηκαν για τη δοκιμή ενδεχόμενης διασταυρούμενης αντιδραστικότητας των δοκιμασιών, συμπεριλαμβανομένων των παρακάτω πληθυσμών ασθενών: κοιλιοκάκη (5), θετική σε αντισώματα συνεκτική νόσος εξαγωγίμου πυρηνικού αντιγόνου (12), θυρεοειδίτιδα του Hashimoto (6), ρευματοειδής αρθρίτιδα (5), και συστηματικός ερυθρεμάτης λύκος (5). Ένα δείγμα ρευματοειδούς αρθρίτιδας ήταν θετικό αποδίδοντας θετική τιμή 3,3% στον πληθυσμό αυτό.

Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε με την ανάμειξη ορών με γνωστά αποτελέσματα αντιγόνου 68 kD (hsp-70) με δείγματα ορού πιθανώς παρεμβαλλόμενα και με την μελέτη απόκλισης από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Καμία σημαντική παρέμβαση που να επηρεάζει τα ποιοτικά αποτελέσματα δεν εκδηλώθηκε για τις ακόλουθες ουσίες στα επίπεδα που αναφέρονται: αιμοσφαιρίνη (2 g/L), χολερυθρίνη (342 μmol/L), τριγλυκερίδια (25 mg/ml) και Ρευματοειδής Παράγοντας (100 EU/ml).

ImmcoStripe™ Anticuerpo 68 kD (hsp-70) Inmunoensayo lineal (LIA)

IVD

ETIQUETA DEL PRODUCTO

REF 6001 LIA Anticuerpo 68 kD (hsp-70)

20 Determinaciones

UTILIZACIÓN PREVISTA

Un inmunoensayo lineal para la utilización en la detección e identificación de anticuerpos contra el antígeno 68 kD (hsp-70) asociados con la pérdida auditiva neurosensorial (PANS).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La pérdida auditiva se puede producir por una serie de condiciones. Ciertos tipos de pérdida auditiva se pueden revertir si se diagnostican a tiempo y se establece el tratamiento adecuado. La pérdida auditiva neurosensorial (PANS), comúnmente conocida como sordera neurosensorial, puede ser genética o causada por factores como infecciones o puede ser mediada de manera inmunológica. Un diagnóstico acertado de la PANS se puede realizar con la ayuda de una combinación del historial completo del paciente y análisis de sangre. En la gran mayoría de los casos, no hay causa aparente de PANS: dichos casos se conocen como PANS idiopática. Un subgrupo de casos de PANS idiopática es tratable con terapia inmunosupresora con resultados positivos.^{1,2} El laboratorio trabaja para identificar estos casos que deben incluir pruebas de anticuerpo sérico contra antígeno 68 kD (hsp-70) del oído interno.³⁻⁸ El 22% de los pacientes con PANS bilateral de progresión rápida y el 30% de los pacientes con la enfermedad de Meniere tenían anticuerpos que reaccionaron al antígeno 68 kD presente en extractos de oído interno bovino.⁷ Los anticuerpos anti-68 kD (hsp-70) también se dan aproximadamente en el 60% de los pacientes con síndrome de Meniere bilateral, en el 35% con síndrome de Meniere unilateral y en el 37% de pacientes con hidropesía endolinfática retrasada contralateral. En casos donde los corticosteroides están contraindicados, se pueden recetar tratamientos de metotrexato o cytoxan.⁹

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Este inmunoensayo lineal utiliza antígeno recombinante hsp-70 inducible y purificado (rhsp-70) procedente del riñón de bovino. El antígeno hsp-70 se inmoviliza en tiras de membrana de nitrocelulosa junto con líneas de control de conjugado, suero y corte. Las líneas de control de suero y conjugado sirven como controles de procedimiento interno para verificar la adición de suero y conjugado respectivamente. La línea de corte ofrece un patrón colorimétrico para la evaluación de la línea de prueba hsp-70 de reacción.

Para realizar el ensayo, las tiras se incuban con suero de paciente diluido. En sueros positivos, los anticuerpos se unen específicamente a la proteína rhsp-70 en la tira. Las tiras se lavan siguiendo el protocolo y el conjugado reconstituido se añade a las tiras de prueba. Después de la incubación y las etapas de lavado, el sustrato listo para usar se añade a las tiras. Durante los 10 minutos de incubación, la unión de conjugado y sustrato produce unas líneas violetas visibles para las líneas de control de suero, conjugado y corte. Si la muestra es positiva para los anticuerpos anti-hsp-70, la línea de prueba mostrará una reacción más intensa que la línea de corte. Las reacciones se leen visualmente y se registran como positivas, negativas o ambiguas (análogo a la línea de corte).

Materiales proporcionados

68 kD (hsp-70) Antibody LIA

REF 6001

El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 20 determinaciones.

20 x STRIP|HSP70|LIA

Tiras de prueba para inmunoensayo lineal, que contienen líneas de prueba y líneas de control recubiertas de antígeno antinuclear. Lista para su utilización.

1 x 120 µl CONTROL+|HSP70

Control Positivo (tapón rojo). Contiene suero humano positivo en anticuerpos contra antígeno HSp70.

1 x 30 ml CONJ|LIA

Conjugado IgG.

1 x 30 ml SUBSTRATE

Sustrato de enzima (botella ámbar). Listo para su utilización. **Proteger de la luz.**

1 x 50 ml SAMPLE|DIL

Diluyente/Bloqueo

ES

1 x 50 ml

BUF|WASH|LIA

Tapón de lavado concentrado. Reconstituir a un litro con agua desionizada o destilada o según se necesite proporcionalmente.

2 x

Bandejas de ensayo LIA 10

1 x

Hoja de informe/puntuación

Símbolos empleados en las etiquetas:

LOT

Número de lote

REF

Número de catálogo

IVD

Utilización diagnóstica in vitro



Utilizar antes de



Temperatura de almacenamiento



Consulte las instrucciones de uso



Número de análisis



Fabricante



Fecha de fabricación

Materiales necesarios pero no suministrados

- Probeta graduada limpia de 1000 ml
- Fórceps sin dientes (Fórceps para filtro)
- Graneador o agitador de plataforma giratoria
- Papel absorbente o toallitas de papel
- Agua desionizada o destilada
- Botellas de plástico blando para almacenar tapón de lavado diluido o agua destilada
- Pipetas capaces de suministrar de 10 µl a 1000 µl
- Extremos de pipeta desechables
- Temporizador

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conserve todos los reactivos entre 2 y 8 °C. **No los congele.**

Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18–25 °C) y mezclarse de forma homogénea antes de su utilización. No lo utilice si el reactivo no está limpio o si contiene un precipitado insoluble. Tras la reconstitución, los reactivos estarán estables hasta la fecha de caducidad que se indica mientras se almacenen entre 2 y 8 °C y se preserven de la contaminación, salvo que se indique lo contrario a continuación:

- Las tiras de prueba recubiertas de antígeno **STRIP|HSP70|LIA** están listas para su utilización. Deje que la bolsa que contiene las tiras de prueba alcance la temperatura ambiente antes de abrirla para evitar la condensación y el deterioro asociado. Vuelva a colocar en la bolsa las tiras de prueba que no utilice y almacénela entre 2 y 8 °C en un lugar seco y oscuro.
- **El diluyente de muestra** está listo para su utilización **SAMPLE|DIL**. El diluyente de muestra estará estable durante al menos 8 semanas mientras se almacene adecuadamente y se preserve de la contaminación microbiana o química.
- Reconstituir 1 parte de **BUF|WASH|LIA** en 19 partes de agua destilada o desionizada para obtener 1 litro de **tapón de lavado**. El tapón de lavado estará estable durante al menos 8 semanas tras la reconstitución mientras se almacene adecuadamente y se preserve de la contaminación microbiana.
- **CONJ|LIA** y **SUBSTRATE** estarán estables durante al menos 8 semanas tras su primera utilización mientras se almacenen adecuadamente y se preserven de la contaminación microbiana. **SUBSTRATE** es sensible a la luz y debe almacenarse en la botella ámbar que se proporciona.

Las tiras de antígeno se pueden utilizar solo una vez. No cambie los componentes de lotes diferentes. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas.

Precauciones

Todos los componentes provenientes de seres humanos utilizados han sido analizados en busca de HBsAg, HCV, HIV-1 y 2 y HTLV-I y han dado negativo de acuerdo con los exámenes necesarios de la FDA. Sin embargo, los

ES

derivados de sangre humana y las muestras de pacientes deberían considerarse potencialmente infecciosos. Siga unas buenas prácticas de laboratorio a la hora de guardar, preparar y desechar estos materiales.¹⁰

ADVERTENCIA: Proclin 300 es un conservante. A la hora de desechar líquidos que contengan Proclin 300, lavar con abundante agua para diluir los componentes por debajo de los niveles activos.

Deben seguirse las instrucciones exactamente tal como aparecen aquí para garantizar unos resultados válidos. No cambie los componentes del equipo por otros de fuentes externas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio para minimizar la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos a la hora de manejarlos. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas.

RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECÍMENES

En este procedimiento solo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes con hemólisis intensa, niveles altos de lípidos o contaminación microbiana pueden interferir con el rendimiento del análisis y, por lo tanto, no deben utilizarse. Guarde los especímenes entre 2 y 8 °C durante un máximo de una semana. Para períodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Se recomienda analizar los especímenes congelados en el plazo de un año. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente.

PROCEDIMIENTO

Notas del procedimiento

- Lea detenidamente la etiqueta del producto antes de comenzar el ensayo.
- Deje que los especímenes de suero y los reactivos de prueba alcancen la temperatura ambiente durante 30 minutos aproximadamente antes de comenzar con el procedimiento de análisis. Vuelva a meter todos los reactivos y especímenes no utilizados en la nevera inmediatamente después de su utilización.
- Una técnica de lavado adecuada es fundamental para alcanzar satisfactoriamente el rendimiento del ensayo.
- La manipulación de las tiras de prueba debe realizarse únicamente con fórceps o guantes. Evite tocar las zonas blancas de nitrocelulosa.
- Las líneas de prueba están colocadas por encima de (véase la Figura 1 Esquema) las líneas de control de corte, suero y conjugado como se describe en el esquema. Las líneas de control de suero y conjugado aparecen en la misma sección de nitrocelulosa en la parte inferior.
- Asigne números de identificación de especímenes a las tiras correspondientes en el Formulario de informe. Cada tira tiene un número de tira y un número de lote impreso en la parte inferior para que pueda ser localizada.
- Rellene toda la información pertinente en el Formulario de informe antes de comenzar con el ensayo.

Método de análisis

- Paso 1** Utilizando guantes o fórceps hemostáticos, despegue la cantidad necesaria de tiras. Se debe procurar no tocar las zonas recubiertas de nitrocelulosa con las manos desnudas o fórceps puntiagudos.
- Paso 2** Coloque la cantidad necesaria de tiras **STRIP|HSP70|LIA** con la etiqueta hacia arriba en los pozos individuales de la bandeja de ensayo.
- Paso 3** Pipetee 1,5 ml de diluyente de muestra **SAMPLE|DIL** en cada pozo asegurándose de que las tiras queden totalmente sumergidas en el líquido.
- Paso 4** Incube las tiras en diluyente de muestra **SAMPLE|DIL** durante al menos 10 minutos. La línea azul de rastreo comenzará a desaparecer cuando se empape la membrana.
- Paso 5** Pipetee 15 µl de suero o muestra de control en los pozos adecuados para obtener una dilución de 1:101. Incúbelo 60 minutos (±5 min.) a temperatura ambiente en un graneador o agitador giratorio.
- Paso 6** LAVADO: Aspire la solución de muestra en el contenedor de residuos. Lave minuciosamente las tiras con tapón de lavado **BUF|WASH|LIA** aplicando aproximadamente 2 ml de solución directamente en las tiras. Lave las tiras agitándolas suavemente durante 5 minutos y aspire la solución en el contenedor de residuos. Repita el lavado dos veces más. Precaución: Un lavado completo de las tiras entre las incubaciones es fundamental para obtener unos resultados válidos. Un lavado inadecuado implicaría una coloración de fondo elevada. No deje que las tiras se resequen en ninguna de las etapas durante el ensayo.
- Paso 7** Pipetee 1,0 ml de conjugado **CONJ|LIA** en cada pozo. Incúbelo 30 minutos (±5 min.) a temperatura ambiente en un graneador o agitador giratorio.
- Paso 8** Repita el Paso 6.
- Paso 9** Pipetee 1,0 ml **SUBSTRATE** en cada pozo e incúbelo agitando suavemente durante 10 minutos a temperatura ambiente y con poca iluminación. Las líneas de control de suero y conjugado adquieren un

color intenso después de la incubación en el sustrato. La línea de control de corte desarrolla una línea coloreada de negativa a débil después de la incubación.

Paso 10 Para detener la reacción, enjuague las tiras dos veces con agua destilada/desionizada aplicando aproximadamente 2 ml de agua directamente en las tiras y a continuación aspírelas. No las empape/lave durante más de 10 minutos, puesto que esto podría disminuir la sensibilidad de las líneas coloreadas que se han desarrollado.

Paso 11 Utilizando unos fórceps hemostáticos retire las tiras de la bandeja de ensayo y colóquelas suavemente en papel absorbente y déjelas que se sequen. Deje que las tiras se sequen antes de analizarlas o colocarlas en la hoja de informe/puntuación.

Control de calidad

Controles de procedimiento: Cada tira tiene tres controles de procedimiento para la adición de suero o conjugado y línea de corte para determinar las reacciones débiles o negativas.

Los controles positivos y negativos están disponibles como componentes opcionales y se pueden realizar como control de calidad adicional.

Se espera que los análisis individuales mejoren el tiempo del desarrollo del sustrato en +/-2 minutos basándose en el procesador o métodos de borrón que ellos utilizan. Se sugiere que la línea de corte sea una línea débilmente visible después de las incubaciones con sustrato. Una línea de corte invisible o muy pronunciada sugiere la mejora del tiempo de desarrollo del sustrato para las condiciones de funcionamiento dadas.

Interpretación

Las tiras de prueba contienen líneas de control en la parte inferior y la línea de prueba encima de los controles. La parte inferior de la tira de prueba (cerca del número de serie) tiene tres líneas de control: la línea de corte, la línea de control de suero y la línea de control de conjugado desde arriba hasta abajo. El corte le permite al técnico determinar si el resultado es positivo, negativo o indeterminado (+/-). Las dos líneas de control del procedimiento aseguran la adición de espécimen, conjugado o sustrato.

Compare la reacción de la línea de prueba con aquellas de los controles. Utilice una lupa para ayudarle en la observación de las reacciones débiles.

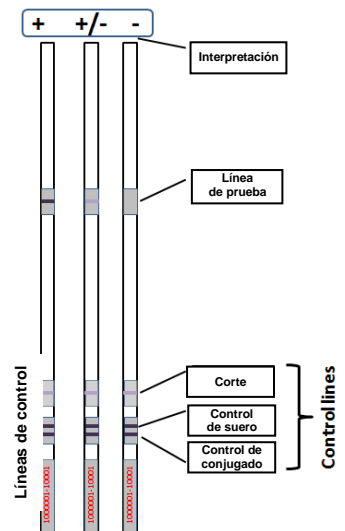


Figura 1: Esquema de las tiras LIA de reacción con una línea de prueba.

- Como aparece en la etiqueta de la Figura 1, las líneas de control de suero y conjugado deben ser claramente positivas indicando que el experimento tuvo éxito. El corte es una línea débil con variación en intensidad basado en las condiciones experimentales. El esquema de la Figura 1 muestra un ejemplo de línea de prueba y 3 líneas de control. El desarrollo de la línea de prueba depende de la muestra. Las reacciones positivas pueden presentar intensidades variables de débil a fuerte. **Las reacciones débiles deben compararse con la intensidad de la línea de corte que se facilita en la tira.** Las reacciones que son claramente más oscuras o más densas que la intensidad de la línea de corte deben considerarse positivas.
- Las tiras deben mostrar un fondo descolorido u homogéneo debido a los diversos factores que interfieren en los sueros lipémicos o hemolíticos. Asimismo, este efecto se puede ver si las tiras de prueba no se bloquean lo suficiente o se permite accidentalmente que se sequen durante el ensayo.
- En caso de reacciones positivas o negativas débiles, la intensidad de la línea de reacción debe compararse con la línea de corte para determinar el resultado como negativo (intensidad más débil que la línea de corte) o ambiguo (+/-). Indistinguible de la línea de corte).
- Las tiras secas se pueden agrupar en la hoja de informe/puntuación que se facilita. La tapa de protección de plástico está fija permanentemente a la hoja de informe en el borde izquierdo. Despegue con cuidado la tapa de plástico de derecha a izquierda como al pasar la página de un libro. Coloque las tiras de reacción en la cinta adhesiva en el espacio correspondiente y vuelva a colocar la tapa de plástico en su lugar. La tapa de protección de plástico está diseñada para que se reutilice en múltiples secciones de experimentos y las tiras se pueden colocar en los espacios correspondientes. El técnico puede utilizar el formulario para registrar los números de lote de los reactivos utilizados, el número de espécimen y los resultados/comentarios.

El formulario de Immcó incluye los siguientes campos: 'Immcó', 'iStat® 8SD (lip-1) Antibody Line Immunoassay (LIA)', 'Date', 'Lot #', 'Technician'. Hay una tabla con columnas para 'Lot #', 'Date', 'Time', 'Result'. También hay un espacio para 'Comments/Remarks'.

Figura 2: Esquema de la hoja de informe

ES LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En este procedimiento solo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. No conserve los especímenes entre 2 y 8 °C durante más de una semana. Para períodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente.

En inmunoensayo lineal de anticuerpo 68 kD (hsp-70) se debe utilizar como ayuda en el diagnóstico. Los resultados positivos se pueden encontrar en otras condiciones autoinmunitarias o varias enfermedades infecciosas. Como consecuencia una autoridad médica debe valorar e interpretar los resultados en función del historial clínico del paciente y otros resultados de laboratorio. En ocasiones, algunos sueros pueden reaccionar ante el indicador de PM, cuyo significado se ignora.

VALORES ESPERADOS

Los anticuerpos contra el antígeno 68 kD (hsp-70) se da en pacientes con PANS idiopática activa y los títulos de anticuerpo se han demostrado que están correlacionados con la actividad de la enfermedad.

Anticuerpos contra Anti-68 kD (hsp-70) en pacientes con PANS bilateral idiopática¹¹

Grupo de enfermedad	N.º analizados	N.º positivo	% Positivo
PANSIPB	72	42	58
Otosclerosis	11	0	0
Síndrome de Cogan	8	0	0
Normales	53	1	2

Correlación de reactividad de anticuerpos Anti-68 kD (hsp-70) ante la actividad de la enfermedad¹¹

Actividad de la enfermedad	Anticuerpo Anti-68 kD
Activo	89%
Inactivo	0%

Un estudio de terceros sobre 34 pacientes con pérdida auditiva de progresión rápida demostró que el anti-rhsp-70 OTOBlot tenía un 42% de sensibilidad, 90% de especificidad y un valor predictivo positivo del 91% para pronosticar una respuesta a esteroide.¹²

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

La utilidad del inmunoensayo lineal del anticuerpo ImmuStripe™ 68 kD (hsp-70) se valoró analizando especímenes bien caracterizados de pacientes de PANS, pacientes de pérdida auditiva idiopática, controles de enfermedad y suero humano "normal". Los resultados se resumen a continuación:

		Estados clínicos		
		Positivo	Negativo	Total
68 KD	Positivo	36	2	38
(hsp-70)	Negativo*	14	79	93
LIA	Total	50	81	131
Sensibilidad:		72,0%		
Especificidad:		97,5%		
Acuerdo clínico:		87,8%		

* Las muestras indeterminadas se consideraron negativas.

Sujetos de PANS/Sordera idiopática: 50
Controles de enfermedad: 33
Sujetos normales sanos: 48

Reproducibilidad

Ensayos de muestras en el ámbito negativo, ambiguo o positivo se realizaron para determinar la reproducibilidad cualitativa de prueba a prueba y de operador a operador. Los resultados produjeron un acuerdo cualitativo del 100%.

ES

Reactividad cruzada

Los controles de enfermedad autoinmunitaria reaccionaron para probar la reactividad cruzada potencial de los ensayos, incluyendo las siguientes poblaciones de pacientes: enfermedad celíaca (5), enfermedad del tejido conectivo positiva de anticuerpos y antígenos nucleares extraíbles (12), tiroiditis de Hashimoto (6), reumatismo crónico (5) y lupus eritematoso sistémico (5). Un espécimen de artritis reumatoide dio positivo resultando en un índice positivo de 3,3% en esta población.

Interferencia

La interferencia se estudió mezclando sueros con resultados de anticuerpos 68 kD (hsp-70) conocidos con muestras potenciales de suero que interfieren y estudiando la desviación de los resultados esperados. No se demostró una interferencia importante de impacto en los resultados cualitativos para las siguientes sustancias en los niveles indicados: hemoglobina (2 g/L), bilirrubina (342 μ mol/L), triglicéridos (25 mg/ml) y factor reumatoide (100 EU/ml).

ImmcoStripe™ 68 kD (hsp-70) Antikörper Linienimmunoassay (LIA)

IVD

BEIPACKTEXT

REF 6001 68 kD (hsp-70) Antibody LIA 20 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Ein Linienimmunoassay zur Verwendung beim Nachweis und der Identifizierung von Antikörpern gegen das 68 kD (hsp-70) Antigen verbunden mit sensorischem Hörverlust (SNHL).

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Hörverlust kann durch eine Anzahl von Zuständen verursacht werden. Bestimmte Arten von Hörverlust können rückgängig gemacht werden, wenn sie früh diagnostiziert werden und eine angemessene Behandlung eingeleitet wird. Sensorischer Hörverlust (SNHL), allgemein als Nervtaubheit bezeichnet, kann durch genetische oder erworbene Faktoren, wie beispielsweise Infektionen, verursacht oder immunologisch vermittelt werden. Die korrekte Diagnose von SNHL kann mithilfe einer Kombination aus umfangreichen Patientenanamnesen und Laborstudien erfolgen. In der Mehrzahl aller Fälle ist keine Ursache von SNHL offensichtlich: solche Fälle werden als idiopathische SNHL bezeichnet. Eine Untergruppe von idiopathischen SNHL-Fällen ist mit der immunosuppressiven Therapie mit zufriedenstellenden Ergebnissen therapierbar.^{1,2} Die Laborarbeit bis zur Identifizierung dieser Fälle sollte Serum-Antikörpertests gegen das 68 kD (hsp-70) Innenohrantigen einschließen.³⁻⁸ Zweiundzwanzig Prozent der Patienten mit beidseitigem rasch fortschreitendem SNHL und 30 % der Patienten mit der Ménière-Krankheit hatten Antikörper, die gegen das in den Rinderinnenohrextrakten vorhandene 68 kD Antigen reagierten.⁷ Anti-68 kD (hsp-70) Antikörper treten auch bei annähernd 60 % der Patienten mit beidseitigem und 35 % der Patienten mit einseitigem Meniere-Syndrom und bei 37 % der Patienten mit kontralateral verzögertem endolymphatischem Hydrops auf. In Situationen, wo Corticosteroide kontraindiziert sind, kann eine Methotrexat- oder Cytoxan-Behandlung verordnet werden.⁹

GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS

Dieser Linienimmunoassay verwendet gereinigtes rekombinantes induzierbares hsp-70 Antigen (rhsp-70) von einer Rinderniere. Das hsp-70 Antigen wird auf Nitrozellulosemembran-Streifen zusammen mit dem Konjugat, dem Serum und den Cut-Off-Kontrolllinien immobilisiert. Die Serum- und Konjugatkontrolllinien dienen als interne Prozedurkontrollen, um die Hinzufügung des Serums und des Konjugats zu verifizieren. Die Cut-Off-Linie bietet einen kolorimetrischen Standard für die Auswertung der reagierten hsp-70 Testlinie.

Zur Ausführung des Tests werden Streifen mit dem verdünnten Patientenserum inkubiert. In positiven Seren binden sich Antikörper speziell an das rhsp-70 Protein auf dem Streifen. Die Streifen werden gemäß dem Protokoll gewaschen und das rekonstituierte Konjugat wird zu den Teststreifen hinzugefügt. Nach der Inkubation und den Waschschrritten wird das gebrauchsfertige Substrat zu den Streifen hinzugefügt. Während einer 10-minütigen Inkubation erzeugt die Konjugat- und Substratbindung sichtbare violette Linien für Serum-, Konjugat- und Cut-Off-Kontrolllinien. Wenn die Probe anti-hsp-70 Antikörper-positiv ist, zeigt die Testlinie eine Reaktion, die intensiver ist als die Cut-Off-Linie. Die Reaktionen werden visuell abgelesen und als positiv, negativ oder zweideutig (im Vergleich zur Cut-off-Linie) angeben.

Mitgelieferte Materialien

68 kD (hsp-70) Antibody LIA REF 6001

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 20 Bestimmungen.

20 x STRIP|HSP70|LIA

Linienimmunoassay-Teststreifen, die antinukleäre mit Antigen beschichtete Testlinien und Kontrolllinien enthalten. Gebrauchsfertig.

1 x 120 µl CONTROL+|HSP70

Positivkontrolle (rote Kappe). Enthält Humanserum positiv für Antikörper gegen das HSp70 Antigen.

DE

1 x 30 ml	CONJ LIA
1 x 30 ml	SUBSTRATE
1 x 50 ml	SAMPLE DIL
1 x 50 ml	BUF WASH LIA
2 x	
1 x	

IgG Konjugat.

Enzymsubstrat (bernsteinfarbene Flasche). Gebrauchsfertig. **Vor Licht schützen.**










Verdünnungsmittel/Block

Waschpuffer-Konzentrat. Zu einem Liter mit deionisiertem oder destilliertem Wasser oder wie erforderlich proportional **rekonstituieren.**

LIA 10-Well Assay-Platten.

Berichts-/Auswertungsformular.

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

	Chargennummer
	Katalognummer
	In vitro diagnostischer Gebrauch
	Verwenden bis
	Lagertemperatur
	Finden Sie Anweisungen für die Verwendung
	Anzahl an Tests
	Hersteller
	Herstellungsdatum

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Sauberer 1000-ml-Messzylinder
- Nicht gezahnte Pinzette (Filter-Pinzette)
- Wippschüttler
- Saugfähiges Papier oder saugfähige Papiertücher
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflaschen für den verdünnten Waschpuffer oder destilliertes Wasser
- Pipetten für 10 bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Stoppuhr

REAGENZIEN

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2–8°C lagern; **nicht einfrieren.**

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18–25°C) gebracht und gründlich gemischt werden. Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder unlösliche Partikel enthält. Nach der Rekonstitution sind die Reagenzien bis zum angegebenen Ablaufdatum stabil, wenn sie bei 2–8°C und geschützt vor Verunreinigung aufbewahrt werden, es sei denn, es ist nachfolgend anders angegeben:

- Mit Antigen beschichtete Teststreifen **STRIP|HSP70|LIA** sind gebrauchsfertig. Lassen Sie bitte den Teststreifenbeutel vor dem Öffnen Raumtemperatur erreichen, um eine Kondensation und damit verbundene Verschlechterung zu vermeiden. Verpacken Sie bitte nicht genutzte Teststreifen und bewahren Sie sie bei 2–8 °C und dunklen und trockenen Bedingungen auf.
- **Der Probenverdünner** ist gebrauchsfertig **SAMPLE|DIL**. Der Probenverdünner ist für mindestens 8 Wochen haltbar, wenn er richtig gelagert und vor mikrobieller oder chemischer Verunreinigung geschützt wird.
- Rekonstituieren Sie 1 Teil **BUF|WASH|LIA** in 19 Teilen destilliertem oder vollentsalztem Wasser, damit sich 1 Liter **Waschpuffer** ergibt. Der Waschpuffer ist für mindestens 8 Wochen nach der Rekonstitution haltbar, wenn er richtig gelagert und vor mikrobieller Verunreinigung geschützt wird.
- **CONJ|LIA** und **SUBSTRATE** sind für mindestens 8 Wochen nach der Öffnung haltbar, wenn sie richtig gelagert und vor mikrobieller Verunreinigung geschützt werden. **SUBSTRATE** ist lichtempfindlich und muss in der bereitgestellten bernsteinfarbenen Flasche gelagert werden.

Die Antigenstreifen können nur einmal verwendet werden. Tauschen Sie Komponenten von unterschiedlichen Chargen nicht untereinander aus. Verwenden Sie die Reagenzien nicht nach dem auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatum.

Vorsichtsmaßnahmen

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 als potenziell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie die Regeln der guten Laborpraxis bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung der oben genannten Materialien.¹⁰

WARNUNG – Proclin 300 ist ein Konservierungsmittel. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten, die Proclin 300 enthalten, mit reichlich Wasser nach, um die Komponenten bis unter aktive Spiegel zu verdünnen.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kit-Komponenten nicht mit denjenigen von anderen Quellen aus. Befolgen Sie die Regeln der Guten Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatum verwenden.

PROBENENTNAHME UND HANDLING

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Proben mit starker Hämolyse, erhöhter Lipid- oder mikrobieller Verunreinigung können die Leistung des Tests beeinflussen und dürfen deshalb nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2–8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Es wird empfohlen, eingefrorene Proben innerhalb eines Jahres zu prüfen. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie den Beipacktext vor dem Beginn des Tests sorgfältig durch.
- Lassen Sie die Serumproben und Testreagenzien ungefähr 30 Minuten vor dem Beginn des Testverfahrens Raumtemperatur erreichen. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Eine gute Waschmethode ist für zufriedenstellende Leistungen des Tests entscheidend.
- Behandeln Sie Teststreifen nur mit einer sauberen Pinzette oder Handschuhen. Vermeiden Sie das Berühren der weißen Nitrocellulosebereiche.
- Die Testlinien werden oberhalb (siehe schematische Darstellung Abbildung 1) der Cut-Off-, Serum- und Konjugat-Kontrolllinien, wie in der schematischen Darstellung gezeigt, platziert. Serum- und Konjugat-Kontrolllinien erscheinen auf dem gleichen Teil der Nitrocellulose an der Unterseite.
- Ordnen Sie Proben-Identifikationsnummern den entsprechenden Streifen auf dem Berichtsformular zu. Auf jedem Streifen ist die Streifennummer und Chargennummer auf der Unterseite zur Rückverfolgbarkeit aufgedruckt.
- Tragen Sie alle anderen relevanten Informationen im Berichtsformular ein, bevor Sie mit dem Test beginnen.

Testmethode

- Schritt 1** Ziehen Sie unter Verwendung von Handschuhen oder einer abgerundeten Pinzette die erforderliche Anzahl an Streifen ab. Lassen Sie Vorsicht walten, um die mit Nitrocellulose beschichteten Bereiche nicht mit bloßen Händen oder einer spitzen Pinzette zu berühren.
- Schritt 2** Platzieren Sie die erforderliche Anzahl an Streifen **[STRIP|HSP70|LIA]** mit der bezeichneten Seite nach oben in individuelle Vertiefungen der Assay-Platte.
- Schritt 3** Pipettieren Sie 1,5 ml des Probenverdünners **[SAMPLE|DIL]** in jede Vertiefung, wobei Sie sicherstellen, dass die Streifen vollständig in die Flüssigkeit eingetaucht sind.
- Schritt 4** Inkubieren Sie die Streifen für mindestens 10 Minuten im Probenverdünner **[SAMPLE|DIL]**. Die blaue Nachverfolgungslinie beginnt zu verschwinden, während die Membran durchtränkt wird.
- Schritt 5** Pipettieren Sie 15 µl des Serums oder der Kontrollprobe in entsprechende Vertiefungen, um eine 1:101-Verdünnung zu erhalten. Inkubieren Sie 60 Minuten (±5 min.) bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler.
- Schritt 6** **WASCHEN:** Saugen Sie die Probenlösung in den Abfallbehälter ab. Waschen Sie die Streifen gründlich mit Waschpuffer **[BUF|WASH|LIA]**, indem Sie ungefähr 2 ml der Lösung direkt auf die Streifen spritzen. Waschen Sie die Streifen mit einer sanften Bewegung für 5 Minuten und saugen Sie die Lösung in den Abfallbehälter ab. Wiederholen Sie die Wäsche noch zwei Mal. Vorsicht: Das vollständige Waschen der Streifen zwischen Inkubationen ist entscheidend, um gültige Ergebnisse zu erhalten. Falsches Waschen resultiert in hoher Hintergrundfärbung. Lassen Sie nicht zu, dass die Streifen bei irgendeinem Schritt während des Tests trocken werden.

DE

Schritt 7 Pipettieren Sie 1,0 ml des Konjugats **CONJLIA** in jede Vertiefung. Inkubieren Sie 30 Minuten (± 5 Min.) bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler.

Schritt 8 Wiederholen Sie Schritt 6.

Schritt 9 Pipettieren Sie 1,0 ml **SUBSTRATE** in jede Vertiefung und inkubieren Sie mit sanftem Schütteln 10 Minuten bei Raumtemperatur und reduziertem Licht. Die Serum- und die Konjugat-Kontrolllinien entwickeln eine intensive Farbe nach der Inkubation im Substrat. Die Cut-Off-Kontrolllinie entwickelt sich nach der Inkubation in eine negative bis schwach farbige Linie.

Schritt 10 Um die Reaktion zu stoppen, spülen Sie die Streifen 2x mit destilliertem/vollentsalztem Wasser aus, indem Sie ungefähr 2ml Wasser direkt auf die Streifen spritzen und dann absaugen. Tränken/waschen Sie nicht für länger als 10 Minuten, da dies in verminderter Empfindlichkeit der entwickelten farbigen Linien resultieren kann.

Schritt 11 Entfernen Sie unter Verwendung einer abgerundeten Pinzette Streifen von der Assay-Platte, platzieren Sie sie sanft auf saugfähigem Papier und lassen Sie sie trocknen. Lassen Sie die Streifen vor der Analyse oder dem Befestigen am Berichts-/Auswertungsformular trocken werden.

Qualitätskontrolle

Funktionskontrollen: Jeder Streifen hat drei Funktionskontrollen für das Hinzufügen des Serums und Konjugats und eine Cut-Off-Linie, um die schwachen oder negativen Reaktionen zu bestimmen.

Positiv- und Negativkontrollen sind als optionale Komponenten verfügbar und können als zusätzliche Qualitätskontrolle verwendet werden.

Von individuellen Laboren wird erwartet, dass sie die Substratentwicklungszeit um ± 2 Minuten basierend auf dem Blot-Prozessor oder den Verfahren, die sie verwenden, optimieren. Es wird vorgeschlagen, dass die Cut-Off-Linie eine schwach sichtbare Linie nach Inkubationen mit Substrat sein sollte. Eine unsichtbare oder zu starke Cut-Off-Linie legt die Optimierung der Substrat-Entwicklungszeit für die gegebenen Testbedingungen nahe.

Interpretation

Die Teststreifen enthalten Kontrolllinien an der Unterseite und Testlinien über den Kontrollen. Das untere Ende des Teststreifens (in der Nähe der Seriennummer) hat drei Kontrolllinien: die Cut-Off-Linie, die Serum-Kontrolllinie und die Konjugat-Kontrolllinie von oben nach unten. Der Cut-Off ermöglicht dem Techniker, das Prüfergebnis als positiv, negativ oder unbestimmt (+/-) zu bestimmen. Die zwei Kontrolllinien des Verfahrens stellen die Hinzufügung der Probe, des Konjugats und des Substrats sicher.

Vergleichen Sie die Reaktion der Testlinie mit derjenigen der Kontrollen. Das Verwenden eines Vergrößerungsglases kann bei der Beobachtung von schwachen Reaktionen hilfreich sein.

- Wie bezeichnet in Abbildung 1, sollten die Serum- und Konjugat-Kontrolllinien eindeutig positiv sein, was ein erfolgreiches Experiment anzeigt. Der Cut-Off ist eine schwache Linie mit Variation in der Intensität basierend auf den Versuchsbedingungen. Die schematische Darstellung in Abbildung 1 zeigt eine Beispiel-Testlinie und 3 Kontrolllinien. Die Testlinienentwicklung hängt von der Probe ab. Positive Reaktionen können mit variierenden Intensitäten von schwach bis stark auftreten. **Schwache Reaktionen sollten sich im Vergleich zur Intensität der bereitgestellten Cut-Off-Linie innerhalb des Streifens befinden.** Reaktionen, die deutlich dunkler oder dichter sind als die Intensität der Cut-Off-Linie sollten als positiv betrachtet werden.
- Streifen können aufgrund verschiedener beeinträchtigender Faktoren bei lipämischen oder hämolytischen Seren einen homogenen oder verfärbten Hintergrund zeigen. Dieser Effekt kann auch auftreten, wenn die Teststreifen nicht ausreichend blockiert werden oder es ihnen versehentlich ermöglicht wird, während des Tests auszutrocknen.
- Im Falle von schwach positiven und negativen Reaktionen sollte die reagierte Linienintensität mit der Cut-Off-Linie verglichen werden, um das Ergebnis als negativ (schwächere Intensität als die Cut-Off-Linie) oder zweideutig (+/-, Ununterscheidbar von der Cut-Off-Linie) zu bestimmen.
- Getrocknete Streifen können im bereitgestellten Berichts-/Auswertungsformular gesammelt werden. Die schützende Kunststoffflasche ist am Berichtsblatt dauerhaft an der linken Kante angebracht. Heben Sie die Kunststoffflasche sorgfältig von rechts nach links wie eine Buchseite ab. Platzieren Sie die reagierten Streifen auf den

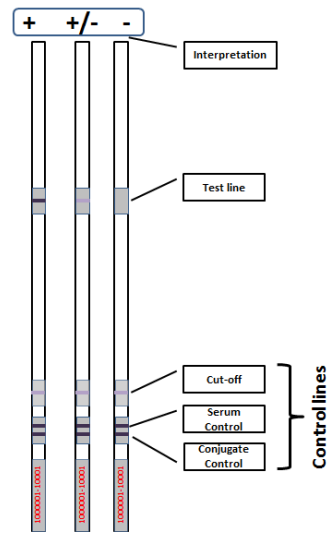


Abbildung 1: Schematische Darstellung von reagierten LIA-Streifen mit einer Testlinie.

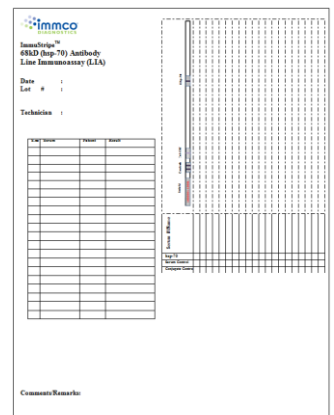


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Berichtsblatts

Klebestreifen im entsprechenden Schlitz und legen Sie die Kunststoffflasche wieder auf. Die schützende Kunststoffflasche ist wiederverwendbar für mehrere Sitzungen von Experimenten ausgelegt und die Streifen können in den entsprechenden Schlitz gesammelt werden. Der Techniker kann das Formular verwenden, um die Chargennummern von verwendeten Reagenzien, Probennummern und Ergebnissen/Kommentaren zu erfassen.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

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 Proben bei 2–8 °C nicht länger als eine Woche. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

Das 68 kD (hsp-70) Antikörper-Linienimmunoassay sollte als eine Hilfe bei der Diagnose verwendet werden. Positive Ergebnisse können bei anderen autoimmunen Bedingungen oder bestimmten ansteckenden Krankheiten festgestellt werden. Deshalb sollten die Ergebnisse durch eine medizinische Behörde angesichts der Krankengeschichte des Patienten und anderer Laborbefunde bewertet und ausgewertet werden. Einige Seren können gelegentlich auf den MW-Marker reagieren, dessen Bedeutung nicht bekannt ist.

ERWARTETE WERTE

Antikörper gegen 68 kD (hsp-70) treten bei Patienten mit aktivem idiopathischem SNHL auf und Antikörpertiter haben gezeigt, dass sie der Krankheitsaktivität entsprechen.

Anti 68 kD (hsp-70) Antikörper bei Patienten mit idiopathischem beidseitigem SNHL¹¹

Krankheitsgruppe	Anz. Getestet	Anz. Positiv	% Positiv
IPBSNHL	72	42	58
Otosklerose	11	0	0
Cogan-Syndrom	8	0	0
Normale	53	1	2

Korrelation von anti 68 kD (hsp-70) Antikörperreaktivität zu Krankheitsaktivität¹¹

Krankheitsaktivität	Anti-68 kD Antikörper
Aktiv	89 %
Inaktiv	0 %

Eine Studie Dritter von 34 Patienten mit rasch fortschreitendem Hörverlust demonstrierte, dass anti-rhsp-70 OTOBlot 42 % Empfindlichkeit, 90 % Spezifität und 91 % positiven Vorhersagewert zur Vorhersage von Steroid-Reaktionsfähigkeit aufwies.¹²

LEISTUNGSMERKMALE

Die Nützlichkeit des ImmuStripe™ 68 kD (hsp-70) Antikörper-Linienimmunoassay wurde durch Testen gut charakterisierter Proben von SNHL-Patienten, idiopathischen Hörverlust-Patienten, Krankheitsbekämpfungen und „normalen“ Humansenen bewertet. Die Ergebnisse sind nachstehend zusammengefasst.

		Klinischer Status		
		Positiv	Negativ	Gesamt
68 KD	Positiv	36	2	38
(hsp-70)	Negativ*	14	79	93
LIA	Gesamt	50	81	131
Sensitivität:		72,0 %		
Spezifität:		97,5 %		
Klinische Übereinstimmung:		87,8 %		

* Unbestimmte Proben wurden als negativ erachtet.

Probanden mit SNHL/idiopathischem Hörverlust: 50

Krankheitskontrollen: 33

Gesunde normale Probanden: 48

DE Reproduzierbarkeit

Tests von Proben im negativen, zweideutigen und positiven Bereich wurden ausgeführt, um die qualitative Reproduzierbarkeit von Test zu Test und Ausführendem zu Ausführendem zu bestimmen. Die Ergebnisse produzierten 100 % qualitative Übereinstimmung.

Kreuzreaktivität

Autoimmunerkrankungskontrollen wurden reagiert, um die potenzielle Kreuzreaktivität der Tests einschließlich der folgenden Patientenpopulationen zu testen: Zöliakie (5), extrahierbare nukleäre Antigen-Antikörper-positive Bindegewebserkrankung (12), Hashimoto-Thyreoiditis (6), Rheumatoidarthritis (5) und systemischer Lupus erythematodes (5). Eine Rheumatoidarthritis-Probe war positiv, was eine positive 3,3%-Rate in dieser Population ergab.

Interferenz

Die Interferenz wurde durch Mischen von Seren mit bekannten 68 kD (hsp-70) Antikörperergebnissen mit potenziell beeinträchtigenden Serumproben und der Abweichung von erwarteten Resultaten studiert. Keine bedeutende Interferenz, die sich auf die qualitativen Resultate auswirkt, wurde für die folgenden Stoffe bei den angezeigten Spiegeln demonstriert: Hämoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 µmol/L), Triglyceride (25 mg/ml) und Rheumafaktor (100 EU/ml).

ImmcoStripe™

Anticorps 68 kD (hsp-70)

Immunoanalyse en Ligne (LIA)

IVD

DESCRIPTION DU PRODUIT

REF 6001 Dosage LIA Anticorps 68 kD (hsp-70) 20 Déterminations

UTILISATION VISÉE

Un dosage d'immunoanalyse en ligne utilisé pour la détection et l'identification d'anticorps à l'antigène 68 kD (hsp-70) associé à une perte d'audition sensorineurale (SNHL).

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Une perte d'audition peut être causée par un certain nombre de conditions. Certains types de pertes d'auditions peuvent être inversés s'ils sont diagnostiqués de façon précoce et si un traitement approprié est mis en place. Une perte d'audition sensorineurale (SNHL), que l'on nomme généralement surdité nerveuse, peut être causée par des facteurs génétiques ou acquis comme des infections ou bien peuvent provenir d'une médiation immunologique. Un diagnostic approprié d'une SNHL peut être effectué à l'aide de la combinaison d'un historique complet du patient et d'analyses laboratoires. Dans la majorité des cas, aucune cause de SNHL n'est apparente : de tels cas sont désignés comme une SNHL idiopathique. Un sous-groupe de cas de SNHL idiopathiques est traitable au moyen d'une thérapie immunosuppressive avec des résultats encourageants.^{1,2} Il convient que le travail de laboratoire visant à identifier ces cas inclue des dosages d'anticorps à l'antigène de l'oreille interne 68 kD (hsp-70).³⁻⁸ 22 % des patients atteints de SNHL à progression rapide bilatérale et 30 % des patients atteints de la maladie de Ménière avaient des anticorps qui ont réagi avec l'antigène 68 kD présent dans les extraits d'oreille interne bovine.⁷ Les anticorps anti-68 kD (hsp-70) sont également présents chez environ 60 % des patients atteints du Syndrome de Ménière unilatéral et chez 37 % des patients atteints d'hydrops endolymphatique différé controlatéral. Dans des situations où les corticostéroïdes sont contraindiqués, un traitement à base de méthotrexate ou de cytoxan peut être prescrit.⁹

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Cette immunoanalyse en ligne utilise un antigène hsp-70 (rhsp-70) inductible par un recombinant purifié provenant de rein bovin. L'antigène hsp-70 est immobilisé sur des bandes de membrane de nitrocellulose avec les lignes de contrôle du conjugué, du sérum et de la limite. Les lignes de contrôle du sérum et du conjugué servent de contrôles de procédure interne afin de vérifier l'ajout du sérum et du conjugué, respectivement. La ligne de limite fournit une norme colorimétrique pour l'évaluation de la ligne de dosage hsp-70 ayant réagi.

Pour effectuer le dosage, les bandes sont incubées avec le sérum de patient dilué. Dans des sera positifs, les anticorps se fixent de manière spécifique à la protéine rhsp-70 sur la bande. Les bandes sont nettoyées conformément au protocole et le conjugué reconstitué est ajouté aux bandes de dosage. Après l'incubation et les étapes du nettoyage, le substrat prêt à l'emploi est ajouté aux bandes. Pendant une incubation d'une durée de 10 minutes, la fixation du conjugué et du substrat produit des lignes violettes visibles pour les lignes de contrôle du sérum, du conjugué et de la limite. Si l'échantillon fourni est positif aux anticorps anti-hsp-70, la ligne de dosage montre une réaction plus intense que la ligne de limite. Les réactions sont lues visuellement et rapportées comme positives, négatives ou équivoques (comparables à la ligne de limite).

Matériel fourni

Dosage LIA Anticorps 68 kD (hsp-70) REF 6001

Les kits contiennent suffisamment de réactifs pour effectuer 20 déterminations.

20 x STRIP|HSP70|LIA

Bandes de dosage d'immunoanalyse en ligne, contenant des lignes de dosage d'antigène antinucléaire et des lignes de contrôle. Prêtes à l'emploi.

1 x 120 µl CONTROL+|HSP70










Contrôle positif (capuchon rouge). Contient du sérum humain testé positif pour les anticorps à l'antigène HSp70.

1 x 30 ml CONJ|LIA

Conjugué IgG.

FR		
1 x 30 ml	SUBSTRATE	Substrat d'enzyme (bouteille ambrée). Prêt à l'emploi. Protéger de la lumière.
1 x 50 ml	SAMPLEDIL	Diluant / Blocage
1 x 50 ml	BUFWASHLIA	Concentré de tampon de lavage. Reconstituer jusqu'à un litre avec de l'eau déminéralisée ou distillée ou proportionnellement selon la quantité nécessaire.
2 x		Plateaux d'analyse à 10 puits LIA
1 x		Fiche de rapport / notation

Symboles utilisés sur les étiquettes:

	Numéro de Lot
	Numéro catalogue
	Utilisation à diagnostic in vitro
	A utiliser avant
	Température de stockage
	Consulter les instructions d'emploi
	Nombre de tests
	Fabricant
	Date de fabrication

Matériel requis mais non fourni

- Cylindre gradué 1 000 ml propre
- Pincette lisse (Pincette à filtre)
- Agitateur ou plate-forme de mélange rotative
- Papier absorbant ou serviettes en papier
- Eau déminéralisée ou distillée
- Pissettes en plastique pour contenir le tampon de lavage ou l'eau distillée
- Pipettes permettant de délivrer 10 µl à 1 000 µl
- Embouts de pipettes jetables
- Chronomètre de laboratoire

RÉACTIFS

Stockage et Préparation

Stocker tous les réactifs à une température comprise entre 2 °C et 8 °C ; **ne pas congeler.**

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (18 °C – 25 °C) et mélangés rigoureusement avant utilisation. Ne pas utiliser un réactif s'il n'est pas clair ou si un précipité insoluble est présent. Après reconstitution, les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée lorsqu'ils sont stockés entre 2 °C et 8 °C et protégés de la contamination, sauf indication contraire ci-dessous :

- Les bandes de dosage coatées avec l'antigène **STRIP|HSP70|LIA** sont prêtes à l'emploi. Attendre que le sac de bandes de dosage parvienne à température ambiante avant de l'ouvrir afin d'éviter toute condensation et détérioration associée. Remettre les bandes de dosage non utilisées dans l'emballage et les stocker entre 2 °C et 8 °C au sec et à l'abri de la lumière.
- Le **diluant d'échantillon** est prêt à l'emploi **SAMPLEDIL**. Le diluant d'échantillon est stable pendant au moins 8 semaines lorsqu'il est stocké de manière appropriée et protégé de la contamination microbienne ou chimique.
- Reconstituer 1 partie de **BUFWASHLIA** dans 19 parties d'eau distillée ou déminéralisée pour obtenir 1 litre de **tampon de lavage**. Le tampon de lavage est stable pendant au moins 8 semaines lorsqu'il est stocké de manière appropriée et protégé de la contamination microbienne.
- **CONJ|LIA** et **SUBSTRATE** sont stables pendant au moins 8 semaines après ouverture lorsqu'ils sont stockés de manière appropriée et protégés de la contamination microbienne. **SUBSTRATE** est sensible à la lumière et doit donc être stocké dans la bouteille de couleur ambrée fournie.

Les bandes d'antigène ne peuvent être utilisées qu'une seule fois. Ne pas interchanger les composants de lots différents. Ne pas utiliser de réactifs au delà de la date d'expiration indiquée sur les étiquettes.

FR Précautions

Tous les éléments dérivés du corps humain utilisés ont été testés pour les virus HBsAg, HCV, HIV-1 et 2 et HTLV-1 et le résultat des tests était négatif, conformément aux exigences de la FDA (Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux). Cependant, les dérivés de sang humain et les spécimens des patients doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire lors du stockage, de la délivrance et de l'élimination des matériaux ci-dessus.¹⁰

AVERTISSEMENT – Proclin 300 est un conservateur. Lors de l'élimination de liquides contenant Proclin 300, évacuer avec de grandes quantités d'eau afin de diluer les composants jusqu'à des niveaux situés en dessous des niveaux actifs.

Les instructions doivent être suivies précisément, telles qu'elles apparaissent dans cette notice d'utilisation afin de garantir la validité des résultats. Ne pas interchanger les éléments du kit avec des éléments provenant d'autres sources. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire afin de minimiser la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs lors de la manipulation. Ne pas utiliser les éléments au delà de la date d'expiration qui figure sur les étiquettes.

COLLECTE ET MANIUPULATION DES SPECIMENS

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés pour cette procédure. Des échantillons hémolysés, nettement lipémiques ou contaminés par des microbes peut interférer avec la réalisation du dosage et ceux-ci ne doivent pas être utilisés. Conserver les spécimens entre 2 °C et 8 °C pendant une période inférieure à une semaine. Pour un stockage pendant une période plus longue, il convient que les spécimens de sérum soient congelés. Il est recommandé de tester les spécimens congelés dans un délai d'un an. Éviter de congeler et décongeler plusieurs fois les échantillons.

PROCÉDURE

Notes concernant la procédure

- Lire la description du produit attentivement avant de débiter l'analyse.
- Laisser les spécimens de sérum et les réactifs du dosage s'équilibrer à la température ambiante pendant environ 30 minutes avant de commencer la procédure de dosage. Replacer tous les spécimens et réactifs non utilisés dans le réfrigérateur rapidement après utilisation.
- Une technique de nettoyage appropriée est essentielle afin d'obtenir des performances satisfaisantes pour l'analyse.
- Manipuler les bandes de dosage avec une pincette ou des gants propres uniquement. Éviter de toucher les zones de nitrocellulose blanches.
- Les lignes de dosage sont placées au dessus (voir le Schéma de la Figure 1) des lignes de contrôle de limite, du sérum et du conjugué comme décrit dans le schéma. Les lignes de contrôle du sérum et du conjugué apparaissent sur le même morceau de nitrocellulose en bas.
- Affecter des numéros d'identification des spécimens aux bandes respectives dans le formulaire de rapport. Chaque bande a un numéro de bande et un numéro de lot imprimé en bas pour des raisons de traçabilité.
- Renseigner toutes les informations pertinentes sur le formulaire de rapport avant de débiter l'analyse.

Méthode de Test

Étape 1 En utilisant des gants ou une pincette à compression, prélever le nombre requis de bandes. Il convient d'être attentif à ne pas toucher les zones coatées de nitrocellulose avec les mains nues ou une pincette pointue.

Étape 2 Placer le nombre requis de bandes **[STRIP|HSP70|LIA]** avec le côté marqué vers le haut dans les puits individuels du plateau d'analyse.

Étape 3 Pipeter 1,5 ml de diluant d'échantillon **[SAMPLE|DIL]** dans chaque puits en s'assurant que les bandes sont complètement submergées sous le liquide.

Étape 4 Incuber les bandes dans le diluant d'échantillon **[SAMPLE|DIL]** pendant au moins 10 minutes. La ligne de suivi bleue commence à disparaître lorsque la membrane est trempée.

Étape 5 Pipeter 15 µl de sérum ou d'échantillon de contrôle dans les puits appropriés afin d'obtenir une dilution de 1:101. Incuber pendant 60 minutes (±5 min) à température ambiante sur un agitateur ou un mélangeur rotatif.

Étape 6 **NETTOYER** : Aspirer la solution d'échantillon dans un conteneur à déchets. Nettoyer rigoureusement les bandes avec le tampon de lavage **[BUF|WASH|LIA]** en versant environ 2 ml de solution directement sur les bandes. Nettoyer les bandes par une agitation légère pendant 5 minutes et aspirer la solution dans le conteneur à déchets. Répéter le nettoyage deux fois ou plus. Attention : un nettoyage complet

des bandes entre les incubations est crucial afin d'obtenir des résultats valables. Un nettoyage incorrect a pour conséquence une coloration de fond élevée. Ne laisser les bandes sécher au cours d'aucune des étapes de l'analyse.

Étape 7 Pipeter 1,0 ml de conjugué [CONJLIA] dans chaque puits. Incuber pendant 30 minutes (± 5 min) à température ambiante sur un agitateur ou un mélangeur rotatif.

Étape 8 Répéter l'Étape 6.

Étape 9 Pipeter 1,0 ml de [SUBSTRATE] dans chaque puits et incubé en secouant légèrement pendant 10 minutes à température ambiante et avec une lumière réduite. Les lignes de contrôle du sérum et du conjugué développent une couleur intense après incubation dans le substrat. Les lignes de contrôle de limite évoluent vers une ligne de couleur négative à faible après l'incubation.

Étape 10 Ne pas arrêter la réaction, rincer les bandes 2 fois avec de l'eau distillée / déminéralisée en versant environ 2 ml d'eau directement sur les bandes puis en procédant à une aspiration. Ne pas tremper / nettoyer pendant plus de 10 minutes étant donné que cela peut entraîner une sensibilité moindre des lignes colorées développées.

Étape 11 En utilisant la pincette à compression, retirer les bandes du plateau d'analyse et les placer doucement sur du papier absorbant et les laisser sécher. Laisser les bandes sécher avant de les analyser ou de les fixer sur la fiche de rapport / score.

Contrôle de la qualité

Contrôles de la procédure : chaque bande a trois contrôles de procédure pour l'ajout du sérum et du conjugué et une ligne de limite pour déterminer les réactions faibles ou négatives.

Les contrôles positifs et négatifs sont disponibles comme composants optionnels et peuvent être réalisés comme contrôle supplémentaire de la qualité.

Il est attendu que les laboratoires individuels optimisent le temps de développement du substrat par ± 2 minutes en se basant sur le processeur de buvardage ou les méthodes qu'ils utilisent. Il est suggéré que la ligne de limite soit légèrement visible après les incubations avec le substrat. Une ligne de limite invisible ou trop marquée plaide en faveur d'une optimisation du temps de développement du substrat pour les conditions d'exécution données.

Interprétation

Les bandes de dosage contiennent des lignes de contrôle en bas et une ligne de dosage au dessus des contrôles. L'extrémité inférieure de la bande de dosage (proche du numéro de série) a trois lignes de contrôle : la ligne de limite, la ligne de contrôle du sérum et la ligne de contrôle du conjugué de haut en bas. La limite permet au technicien de déterminer le résultat du dosage comme étant positif, négatif ou indéterminé (+/-). Les deux lignes de contrôle de procédure garantissent l'ajout du spécimen, du conjugué et du substrat.

Comparer la réaction de la ligne de dosage avec celle des contrôles. L'utilisation d'une loupe peut aider à l'observation de réactions faibles.

- Comme représenté sur la Figure 1, il convient que les lignes de contrôle du sérum et du conjugué soient clairement positives, indiquant une expérience réussie. La limite est une ligne claire avec une variation d'intensité basée sur les conditions de l'expérience. Le schéma de la Figure 1 montre un exemple de ligne de dosage et 3 lignes de contrôle. Le développement de la ligne de dosage dépend de l'échantillon. Des réactions positives peuvent se produire avec plusieurs intensités, allant de faibles à intenses. **Il convient que les réactions faibles soient comparées avec l'intensité de la ligne de limite fournie dans la bande.** Il convient que les réactions qui sont nettement plus foncées ou denses que l'intensité de la ligne de limite soient considérées comme positives.
- Les bandes peuvent présenter un fond homogène ou décoloré en raison de divers facteurs d'interférence dans des sera lipémiques ou hémolytiques. Cet effet peut également être constaté si les bandes de dosage ne sont pas suffisamment bloquées ou si on les laisse accidentellement sécher pendant l'analyse.
- En cas de réactions faiblement positives ou négatives, il convient que l'intensité de la ligne qui a réagi soit comparée afin de déterminer le résultat comme négatif (intensité plus faible que la ligne de limite) ou équivoque (+/-). Impossible à distinguer de la ligne de limite).
- Les bandes qui ont séché peuvent être regroupées dans la fiche de rapport / score fournie. Le rabat protecteur en plastique est fixé de façon

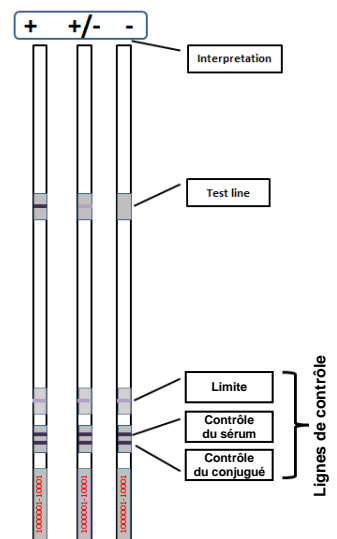


Figure 1 : Schéma des bandes LIA après réaction avec une ligne de dosage.

Figure 2 : Schéma de la fiche de rapport

permanente sur la fiche de rapport sur le côté gauche. Ôter avec précaution le rabat en plastique de la droite vers la gauche comme la page d'un livre. Placer les bandes qui ont réagi sur la bande adhésive dans l'emplacement respectif et repositionner le rabat en plastique en place. Le rabat en plastique protecteur est conçu pour être réutilisable pour plusieurs sessions d'expériences et les bandes peuvent être regroupées dans les emplacements respectifs. Le technicien peut utiliser le formulaire pour enregistrer les numéros de lot des réactifs utilisés, le numéro de spécimen ainsi que les résultats / commentaires.

LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés pour cette procédure. L'emploi d'échantillons hémolysés, nettement lipémiques ou contaminés par des microbes peut interférer avec la réalisation du test et ceux-ci ne doivent pas être utilisés. Ne pas stocker de spécimen entre 2 °C et 8 °C pendant plus d'une semaine. Pour un stockage pendant une période plus longue, il convient que les spécimens de sérum soient congelés. Éviter de congeler et décongeler plusieurs fois les échantillons.

Il convient que l'Immunoanalyse en Ligne Anticorps 68 kD (hsp-70) soit utilisée comme aide à un diagnostic. Des résultats positifs peuvent être obtenus pour d'autres conditions auto-immunes ou pour certaines maladies infectieuses. Par conséquent, il convient que les résultats soient évalués et interprétés par une autorité médicale à la lumière de l'historique médical du patient et d'autres résultats laboratoires. Certains peuvent réagir au marqueur MW occasionnellement, mais la signification de cette réaction n'est pas connue.

VALEURS ATTENDUES

Des anticorps 68 kD (hsp-70) présents chez des patients avec des SNHL idiopathiques actives et des titres d'anticorps correspondent à l'activité de la maladie.

Anticorps anti-68 kD (hsp-70) chez des patients atteints de SNHL bilatérale idiopathique¹¹

Groupe de maladie	Cas testés	Cas positifs	% cas positifs
IPBSNHL	72	42	58
Otosclérose	11	0	0
Syndrome de Cogan	8	0	0
Normaux	53	1	2

Corrélation de la réactivité à l'anticorps anti-68 kD (hsp-70) et de l'activité de la maladie¹¹

Activité de la maladie	Anticorps anti-68 kD
Active	89 %
Inactive	0 %

Un étude tierce sur 34 patients avec une perte d'audition à progression rapide a démontré que anti-rhsp-70 OTOBlot avait une sensibilité de 42 %, une spécificité de 90 % et une valeur prédictive positive de 91 % pour prédire la réactivité des stéroïdes.¹²

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

L'utilité de l'Immunoanalyse en Ligne Anticorps 68 kD (hsp-70) ImmuStripe™ a été évaluée en testant des spécimens caractérisés provenant de patients atteints de SNHL, de patients atteints de perte d'audition idiopathique, des contrôles de maladies et des sera humains « normaux ». Ces résultats sont résumés ci-dessous.

		État clinique		
		Positif	Négatif	Total
68 kD (hsp-70)	Positif	36	2	38
	Négatif*	14	79	93
LIA	Total	50	81	131
Sensibilité :		72,0 %		
Spécificité :		97,5 %		
Cohérence clinique :		87,8 %		

* Les échantillons indéterminés ont été considérés comme négatifs.

Sujets atteints de SNHL / Perte d'audition idiopathique : 50

Contrôles maladie : 33

Sujets normaux en bonne santé : 48

FR

Reproductibilité

Des analyses des échantillons dans la plage négative, équivoque et dans la plage positive ont été réalisées afin de déterminer la reproductibilité quantitative entre deux exécutions et entre deux opérateurs. Les résultats ont déterminé une cohérence qualitative de 100 %.

Réactivité croisée

Les contrôles de maladies auto-immunes ont été soumis à une réaction afin de tester la réactivité croisée potentielle des analyses, y compris les populations de patients suivantes : maladie cœliaque (5), maladie connective positive à un anticorps d'antigène nucléaire soluble (12), thyroïdite de Hashimoto (6), arthrite rhumatoïde (5) et syndrome de lupus érythémateux (5). Un spécimen d'arthrite rhumatoïde était positif, générant un taux positif de 3,3 % pour cette population.

Interférence

L'interférence a été étudiée en mélangeant les sera ayant des résultats d'anticorps 68 kD (hsp-70) connus avec des échantillons de sérum potentiellement interférant puis en étudiant la déviation par rapport aux résultats escomptés. Aucune interférence significative ayant un impact sur les résultats qualitatifs n'a été démontrée pour les substances suivantes aux niveaux indiqués : hémoglobine (2 g/L), bilirubine (342 µmol/L), triglycérides (25 mg/ml) et facteur rhumatoïde (100 Unités Elisa/ml).

ImmcoStripe™ 68 kD (hsp-70) Antibody Line Immunoassay (LIA)

IVD

FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

REF 6001 68 kD (hsp-70) Antibody LIA 20 determinazioni

USO PREVISTO

Un immunodosaggio a linee per il rilevamento e l'identificazione di anticorpi all'antigene 68 kD (hsp-70) associati alla perdita di udito sensoriale (SNHL).

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

La perdita di udito può essere causata da un certo numero di condizioni. Alcuni tipi di perdita di udito possono essere invertiti se diagnosticati in tempo ed è istituito un trattamento appropriato. La perdita di udito neuro-sensoriale (SNHL), comunemente definita sordità neurale, può essere causata da fattori genetici e acquisiti come infezioni o può essere trasmessa immunologicamente. La diagnosi corrente di SNHL può essere effettuata con l'aiuto di una combinazione di studi pazienti completi di cronologia e laboratorio. Nella maggior parte dei casi nessuna causa di SNHL è evidente: tali casi sono definiti col nome di SNHL idiopatico. Un gruppo secondario di casi di SNHL idiopatici è trattabile con terapia immunosoppressiva con risultati soddisfacenti.^{1,2} Il lavoro del laboratorio che identifica questi casi può comprendere test di anticorpi di siero al 68 kD (hsp-70) antigene dell'orecchio interno.³⁻⁸ Il 22% dei pazienti con SNHL rapidamente progressiva bilaterale e il 30% dei pazienti affetti da malattia di Meniere ha anticorpi con antigene 68 kD presente in estratti di orecchio interno di bovino.⁷ Gli anticorpi anti-68 kD (hsp-70) si presentano anche in circa il 60% di pazienti con bilaterale e nel 35% di pazienti con sindrome di Meniere unilaterale e nel 37% di pazienti con idrope endolinfatica ritardata controlaterale. In situazioni in cui i corticosteroidi sono controindicati, sono prescritti trattamenti di metotrexate o chitosano.⁹

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Questo immunodosaggio a linee usa l'antigene hsp-70 (rhsp-70) inducibile ricombinante purificato di rene bovino. L'antigene hsp-70 è immobilizzato su strisce di membrana di nitrocellulosa con le linee di controllo di coniugato, siero e cut-off. Le linee di controllo di siero e coniugato servono come controlli di procedure interne per verificare l'aggiunta rispettivamente di siero e coniugato. La linea di cut-off fornisce uno standard colorimetrico per la valutazione della linea di test hsp-70 reagita.

Per eseguire il test le strisce sono incubate con il siero paziente diluito. Nel siero positivo gli anticorpi si legano in particolare alla proteina rhsp-70 sulla striscia. Le strisce sono lavate secondo il protocollo e il coniugato ricostituito è aggiunto alle strisce per test. Dopo l'incubazione e il lavaggio delle strisce, il substrato pronto per l'uso è aggiunto alle strisce. Durante un'incubazione di 10 minuti, il legame di coniugato e substrato produce linee viola visibili per le linee di controllo di siero, coniugato e cut-off. Se il campione è positivo per anticorpi anti-hsp-70, la linea del test mostrerà una reazione più intensa della linea di cut-off. Le reazioni sono lette visivamente e riportate come positive, negative o equivoche (confrontabili con la linea di cut-off).

Materiale fornito

68 kD (hsp-70) Antibody LIA REF 6001

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 20 determinazioni.

20 x	STRIP HSP70 LIA	Strisce per test per immunodosaggio a linee , contenente linee di test rivestite con antigene antinucleare e linee di controllo. Pronto per l'uso.
1 x 120 µl	CONTROL + HSP70	Controllo positivo (tappo rosso). Contiene siero umano positivo per anticorpi contro antigene HSp70.
1 x 30 ml	CONJ LIA	Coniugato IgG .
1 x 30 ml	SUBSTRATE	Substrato enzimatico (bottiglia ambrata). Pronto per l'uso. Proteggere dalla luce .
1 x 50 ml	SAMPLE DIL	Diluyente/Blocco
1 x 50 ml	BUF WASH LIA	Tampone di lavaggio concentrato . * Ricostituire a un litro con acqua deionizzata o

IT

2 x

distillata o proporzionalmente come necessario.

1 x

LIA 10 vassoi per dosaggio pozzetti

Report/scheda di valutazione

Simboli utilizzati sulle etichette



Codice del lotto



Numero di catalogo



Per uso diagnostico *in vitro*



Utilizzare entro



Temperatura di conservazione



Consultare le istruzioni per l'uso



Numero di test



Fabbricante



Data di fabbricazione

Materiali necessari ma non forniti

- Cilindro graduato 1.000 ml trasparente
- Forcipe non dentato (forcipe filtro)
- Bilanciere o dispositivo vibrante di piattaforma girevole
- Carta assorbente o salviette di carta
- Acqua deionizzata o distillata
- Boccette comprimibili per contenere il tampone di lavaggio diluito o acqua distillata
- Pipette con capacità di erogazione da 10 µl a 1.000 µl
- Puntali monouso per pipette
- Contaminuti

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2–8 °C; **non congelare**.

Tutti i reagenti devono essere tenuti a temperatura ambiente (18–25°C) e miscelati bene prima dell'uso. Non utilizzare se il reagente non è limpido o in presenza di un precipitato non solubile. Dopo l'aggiunta di liquidi, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati a 2–8°C e protetti da contaminazione, se non indicato diversamente di seguito.

- Le strisce per test rivestite con antigene [STRIP|HSP70|LIA] sono pronte per l'uso. Prima dell'apertura, attendere che la busta di strisce per test raggiunga l'equilibrio a temperatura ambiente al fine di evitare la formazione di condensa e deterioramento. Richiudere le strisce per test non utilizzate e conservarle a 2–8°C al buio e in un ambiente asciutto.
- Il **diluyente campione** è pronto per l'uso [SAMPLE|DIL]. Il diluyente campione è stabile per almeno 8 settimane se conservato correttamente e protetto da contaminazione microbica o chimica.
- Ricostituire 1 parte [BUF|WASH|LIA] in 19 parti di acqua distillata o deionizzata per avere 1 litro di **tampone di lavaggio**. Il tampone di lavaggio è stabile per almeno 8 settimane dopo l'aggiunta di liquidi se conservato correttamente e protetto da contaminazione microbica.
- [CONJ|LIA] e [SUBSTRATE] sono stabili per almeno 8 settimane dopo l'apertura se conservati correttamente e protetti da contaminazione microbica. [SUBSTRATE] è sensibile alla luce e deve essere conservato nella bottiglia ambrata fornita.

Le strisce di antigeni sono monouso. Non scambiare componenti di tipi diversi. Non usare reagenti oltre la data di scadenza indicata sulle etichette.

Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana utilizzati sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 e HTLV-I e sono risultati negativi in base ai test richiesti dalla FDA. Gli emoderivati umani e i campioni dei pazienti vanno tuttavia considerati potenzialmente infettivi. Seguire le buone pratiche di laboratorio durante la conservazione, la preparazione, la distribuzione e lo smaltimento di questi materiali.¹⁰

IT

AVVERTENZA – Proclin 300 è un conservante. Dopo lo smaltimento di liquidi contenenti Proclin 300, lavare con abbondante acqua per diluire i componenti al di sotto dei livelli attivi.

Per ottenere risultati validi, le istruzioni devono essere osservate esattamente come compaiono in questo foglietto del kit. Non scambiare i componenti del kit con quelli di altre fonti. Seguire le buone pratiche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti. Non usare i componenti del kit oltre la data di scadenza indicata sulle etichette.

PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

In questa procedura utilizzare solo campioni di siero. I campioni con emolisi grave, lipidi elevati o contaminazione microbica possono interferire con la prestazione del test e quindi non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a 2–8°C per una settimana al massimo. Per conservazioni più prolungate, congelare i campioni di siero. Si consiglia di testare campione congelati entro un anno. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni.

PROCEDURA

Note sulla procedura

- Prima di iniziare il dosaggio, leggere attentamente il foglio illustrativo del prodotto.
- Prima di avviare la procedura del test, attendere che i campioni del siero e i reagenti del test raggiungano l'equilibrio a temperatura ambiente per ca. 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso, rimettere in frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
- È fondamentale una tecnica di lavaggio valida per un risultato soddisfacente del dosaggio.
- Manipolare le strisce del test solo con il forcipe o guanti. Non toccare le zone di nitrocellulosa bianche.
- Le linee per test sono messe sopra (far riferimento alla Fig. 1 Schema) le linee di controllo di cut-off, siero e coniugato come descritte nello schema. Le linee di controllo siero e coniugato compaiono sullo stesso posto di nitrocellulosa sul fondo.
- Assegnare i numeri di identificazione dei campioni alle rispettive strisce sul report. Ogni striscia presente il numero di striscia e il numero di lotto stampato sul fondo per rintracciabilità.
- Inserire tutte le informazioni importanti sul report prima di iniziare il dosaggio.

Metodo del test

- Passaggio 1** Con dei guanti o un forcipe smussato aprire il numero necessario di strisce. Far attenzione a non toccare le zone rivestite in nitrocellulosa a mani nude o con un forcipe appuntito.
- Passaggio 2** Mettere il numero necessario di strisce **STRIP|HSP70|LIA** etichettate rivolte verso l'alto nei singoli pozzetti del vassoio di dosaggio.
- Passaggio 3** Pipettare 1,5 ml di diluente campione **SAMPLE|DIL** in ogni pozzetto verificando che le strisce siano completamente nel liquido.
- Passaggio 4** Incubare le strisce in diluente campione **SAMPLE|DIL** per almeno 10 minuti. La linea di controllo blu inizia a scomparire mentre la membrana si bagna.
- Passaggio 5** Pipettare 15 µl di campione di siero o di controllo nei pozzetti appropriati per ottenere una miscela di 1:101. Incubare per 60 minuti (±5 min.) a temperatura ambiente su un bilanciere o dispositivo vibrante.
- Passaggio 6** LAVAGGIO: Aspirare la soluzione campione nel contenitore rifiuti. Lavare per bene le strisce con un tampone di lavaggio **BUF|WASH|LIA** spruzzando circa 2 ml di soluzione direttamente sulle strisce. Lavare le strisce agitando con cura per 5 minuti e aspirare la soluzione nel contenitore per rifiuti. Ripetere il lavaggio altre due volte. Attenzione: È fondamentale una tecnica di lavaggio completa per ottenere risultati validi. Un lavaggio improprio determina la colorazione del fondo. Far attenzione a non far asciugare le strisce in nessun momento durante il dosaggio.
- Passaggio 7** Pipettare 1,0 ml di coniugato **CONJ|LIA** in ogni pozzetto. Incubare per 30 minuti (±5 min.) a temperatura ambiente su un bilanciere o dispositivo vibrante.
- Passaggio 8** Ripetere il passaggio 6.
- Passaggio 9** Pipettare 1,0 ml di **SUBSTRATE** in ogni micropozzetto e incubare agitando con cura per 10 minuti (±5 min) a temperatura ambiente e luce soffusa. Le linee di controllo di siero e coniugato sviluppano un colore intenso dopo l'incubazione nel substrato. La linea di controllo di cut-off sviluppa una linea da negativa a lievemente colorata dopo l'incubazione.
- Passaggio 10** Per interrompere la reazione, sciacquare 2 strisce con acqua distillata/deionizzata spruzzando circa 2 ml di acqua direttamente sulle strisce e poi aspirare. Non immergere/lavare per più di 10 minuti in quanto si rischia di ridurre la sensibilità delle linee colorate sviluppate.

Passaggio 11 Con un forcipe smussato togliere le strisce dal vassoio di dosaggio, metterle con cura su della carta assorbente e attendere che si asciughino. Far asciugare le strisce prima di analizzarle e porle sul report/scheda di valutazione.

Controllo di qualità

Controlli procedurali: Ogni striscia presenta tre controlli procedurali per l'aggiunta del siero e del coniugato e di una linea di cut-off al fine di determinare le reazioni deboli o negative.

I controlli positivi e negativi sono disponibili come componenti opzionali e possono essere eseguiti per un altro controllo di qualità.

I singoli laboratori devono ottimizzare il tempo di sviluppo del substrato di +/-2 minuti in base al processore di blot o ai metodi che usano. Si consiglia che la linea di cut-off debba una linea lievemente visibile dopo le incubazioni con substrato. Una linea di cut-off invisibile o troppo marcata suggerisce ottimizzazione del tempo di sviluppo del substrato per le condizioni di esecuzione fornite.

Interpretazione

Le strisce per test contengono linee di controllo sul fondo e una linea di test sopra i controlli. L'estremità inferiore della striscia per test (vicino al numero seriale) presenta tre linee di controllo: la linea di cut-off, la linea di controllo siero e la linea di controllo coniugato dall'alto verso il basso. Il cut-off consente al tecnico di determinare il risultato del test come positivo, negativo o indeterminato (+/-). Le due linee di controllo procedura garantiscono l'aggiunta di campione, coniugato e substrato.

Confrontare la reazione della linea del test con quelle dei controlli. Usare una lente di ingrandimento per osservare meglio le reazioni deboli.

- Come etichettato in Figura 1, le linee di controllo di siero e coniugato devono essere chiaramente positive per indicare un esperimento di successo. Il cut-off è una linea debole con variazione in intensità in base alle condizioni sperimentali. Lo schema nella Figura 1 mostra un esempio della linea di test e 3 linee di controllo. Lo sviluppo della linea di test dipende dal campione. Le reazioni positive possono verificarsi in intensità variabili da debole a forte. **Le reazioni deboli devono essere confrontate con l'intensità della linea di cut-off fornita nella striscia.** Le reazioni che sono notevolmente più scure o più dense rispetto alla densità della linea di cut-off devono essere considerate positive.
- Le strisce possono mostrare uno sfondo omogeneo o scolorito a causa di diversi fattori che interferiscono nel siero lipemico o emolitico. Questo effetto può essere visto anche se le strisce per test non sono sufficientemente bloccate o se dovesse capitare che si asciugano durante il dosaggio.
- Nel caso di reazioni deboli positive e negative, l'intensità della linea che reagisce deve essere confrontata con la linea di cut-off per rilevare il risultato negativo (intensità più debole rispetto alla linea di cut-off) o incerto (+/-, indistinguibile dalla linea di cut-off).
- Le strisce asciutte possono essere messe assieme nel report/foglio di valutazione. La linguetta protettiva in plastica è applicata in modo permanente al report sul bordo sinistro. Tirare con cura la linguetta protettiva in direzione da destra a sinistra come la pagina di un libro. Mettere le strisce che hanno reagito sul nastro adesivo nella rispettiva fessura e coprirle con la linguetta in plastica e rimetterle a posto. La linguetta in plastica protettiva è progettata per essere riutilizzata per diverse sessioni di esperimenti e le strisce possono essere messe assieme nelle rispettive fessure. Il tecnico può usare il modello per registrare i numeri del lotto di reagenti usati, il numero di campioni e i risultati/commenti.

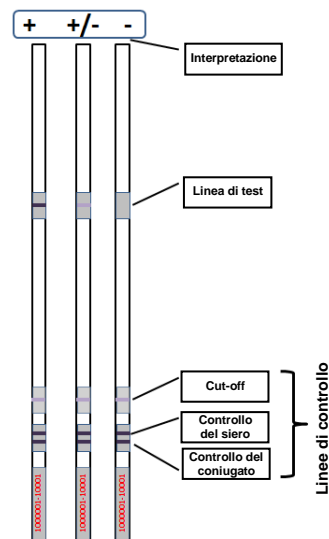


Figura 1: Schema delle strisce LIA dopo reazione con una linea di test.

Figura 2: Schema del report

LIMITI DELLA PROCEDURA

In questa procedura utilizzare solo campioni di siero. I campioni che mostrano emolisi macroscopica, lipemia o contaminazione microbica possono interferire con le prestazioni del test e non devono essere utilizzati. Non conservare i campioni a 2–8°C per più di una settimana. Per conservazioni più prolungate, congelare i campioni di siero. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni.

Il 68 kD (hsp-70) Antibody Line Immunoassay deve essere usato come supporto alla diagnosi. I risultati positivi possono essere trovati in altre condizioni autoimmuni o alcune malattie infettive. I risultati devono essere valutati e interpretati da un ente sanitario alla luce della storia clinica del pazienti e delle altre scoperte di laboratorio. Del siero potrebbe reagire occasionalmente all'indicatore MW, il cui significato è sconosciuto.

IT VALORI PREVISTI

Gli anticorpi a 68 kD (hsp-70) si presentano in pazienti con SNHL idiopatico attivo e titoli anticorpali compaiono per essere in correlazione con l'attività della malattia.

Anticorpi anti-68 kD (hsp-70) in pazienti con SNHL bilaterale idiopatico¹¹

Gruppo	Nu. testati	Nu. positivi	% positivi
IPBSNHL	72	42	58
Otosclerosi	11	0	0
Sindrome di Cogan	8	0	0
Normale	53	1	2

Correlazione della reattività di anticorpi anti-68 kD (hsp-70) con attività della malattia¹¹

Attività della malattia	Anticorpo anti-68 kD
Attivo	89%
Inattivo	0%

Uno studio di terzi su 34 pazienti con perdita di udito rapidamente progressiva ha dimostrato che anti-rhsp-70 OTOBlot hanno presentato una sensibilità del 42%, specificità del 90% e un valore predittivo positivo del 91% per risposta steroide predittiva.¹²

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

L'utilità dell'ImmuStripe™ 68 kD (hsp-70) Antibody Line Immunoassay è stata valutata testando campione ben caratterizzati da soggetti con SNHL, perdita di udito idiopatico, controlli della malattia e siero umano "normale". Questi risultati sono riepilogati di seguito.

		Stato clinico		
		Positivo	Negativo	Totale
68 kD	Positivo	36	2	38
(hsp-70)	Negativo*	14	79	93
LIA	Totale	50	81	131
Sensibilità:		72,0%		
Specificità:		97,5%		
Concordanza clinica:		87,8%		

* I campioni indeterminati sono stati considerati negativi.

Soggetti SNHL/perdita di udito idiopatico: 50

Controlli di malattia: 33

Soggetti normali sani: 48

Riproducibilità

I dosaggi di campioni nell'intervallo negativo, incerto e nell'intervallo positivo sono stati eseguiti per determinare la riproducibilità qualitativa da sessione a sessione e da operatore a operatore. I risultati hanno prodotto una concordanza qualitativa del 100%.

Reattività crociata

I controlli di malattia autoimmune sono stati testati per valutarne la reattività crociata potenziale dei dosaggi, comprese le seguenti popolazioni di pazienti: malattia celiaca (5), malattia connettiva positiva di anticorpi con antigeni nucleari estraibili (12), tiroidite di Hashimoto (6), artrite reumatoide (5) e lupus eritematoso sistemico (5). Un campione di artrite reumatoide è risultato positivo con un tasso positivo del 3,3% in questa popolazione.

Interferenza

L'interferenza è stata studiata mescolando siero con livelli noti di anticorpo (hsp-70) 68 kD con campioni di siero potenzialmente interferenti e studiando la deviazione dai risultati previsti. Non è stata dimostrata un'interferenza significativa sui risultati qualitativi per le seguenti sostanze ai livelli indicati: emoglobina (2 g/l), bilirubina (342 µmol/l), trigliceridi (25 mg/ml) e fattore reumatoide (100 UE/ml).

ImmcoStripe™ Imunoensaio de Linha (LIA) Para Confirmar a Presença de Anticorpos Anti-68 kD (hsp-70)

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 6001 LIA Anticorpos Anti-68 kD (hsp-70) 20 Determinações

APLICAÇÃO

Um imunoensaio de linha para utilização na detecção e identificação de anticorpos contra o antígeno de 68 kD (hsp-70) associado à perda de audição neurossensorial (SNHL).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A perda de audição pode ser provocada por uma série de fatores. Determinados tipos de perda de audição podem ser revertidos se forem diagnosticados precocemente e se for instituído o tratamento apropriado. A perda de audição neurossensorial (SNHL), comumente referida como surdez do nervo, pode ser causada por fatores genéticos ou adquiridos, como infecções, ou pode ser mediada imunologicamente. O diagnóstico correto da SNHL pode ser realizado com a ajuda de uma combinação do historial abrangente do paciente e de estudos laboratoriais. Na maioria dos casos, não existe uma causa aparente para a SNHL: esses casos são mencionados como SNHL (perda de audição neurossensorial) idiopática. Um subgrupo dos casos de SNHL idiopática são tratáveis com terapia imunossupressora com resultados gratificantes.^{1,2} O trabalho laboratorial para identificar estes casos deve incluir testes de anticorpos séricos ao antígeno 68 kD (hsp-70) do ouvido interno.³⁻⁸ Vinte e dois por cento dos pacientes com SNHL bilateral rapidamente progressiva e 30% dos pacientes com doença de Ménière possuíam anticorpos que reagiram com o antígeno 68 kD presente em extratos do ouvido interno de bovinos.⁷ Os anticorpos anti-68 kD (hsp-70) ocorrem igualmente em cerca de 60% dos pacientes com Síndrome de Ménière bilateral e 35% dos pacientes com Síndrome de Ménière unilateral e 37% dos pacientes com hidrops endolinfático retardado contralateral. Nas situações em que os corticosteroides são contraindicados, pode ser prescrito um tratamento de metotrexato ou ciclofosfamida.⁹

PRINCÍPIOS DO MÉTODO

Este imunoensaio de linha utiliza antígeno hsp-70 induzível recombinante purificado (rhsp-70) de rins de bovinos. O antígeno hsp-70 é imobilizado em tiras de membranas de nitrocelulose, juntamente com o conjugado, o soro e as linhas de corte de controlo. O soro e as linhas de controlo do conjugado servem como controlos de procedimentos internos para verificar a adição do soro e do conjugado, respetivamente. A linha de corte fornece um padrão colorimétrico para a avaliação da linha de teste reagida ao hsp-70.

Para realizar o teste, as tiras são incubadas com soro de paciente diluído. Em soros positivos, os anticorpos ligam-se especificamente à proteína rhsp-70 na tira. As tiras são lavadas em conformidade com o protocolo e o conjugado constituído é adicionado às tiras de teste. Após a incubação e os passos de lavagem, o substrato pronto a utilizar é adicionado às tiras. Durante uma incubação de 10 minutos, o conjugado e a fixação do substrato produz linhas visíveis cor de violeta para o soro, o conjugado e as linhas de corte de controlo. Se a amostra for positiva para os anticorpos anti-hsp-70, a linha de teste vai mostrar uma reação mais intensa do que a linha de corte. As reações são lidas visualmente e comunicadas como positivas, negativas ou não conclusivas (comparativamente com a linha de corte).

Materiais fornecidos

68 kD (hsp-70) Anticorpos LIA REF 6001










Cada kit contém reagentes suficientes para executar 20 determinações.

20 x STRIP|HSP70|LIA Tiras de Teste Imunoensaio em Linha, contendo linhas de teste revestidas com antígeno antinuclear e linhas de controlo. Prontas a utilizar.

1 x 120 µl CONTROL+|HSP70 Controlo Positivo (tampa vermelha). Contém soro humano positivo para anticorpos contra antígeno HSp70.

PT		
1 x 30 ml	CONJLIA	Conjugado IgG
1 x 30 ml	SUBSTRATE	Substrato Enzimático (garrafa âmbar). Pronto a utilizar, Proteger da luz.
1 x 50 ml	SAMPLEDIL	Diluyente/Bloco
1 x 50 ml	BUFWASHLIA	Tampão de Lavagem Concentrado.* Reconstituir para um litro com água desionizada ou destilada ou conforme necessário proporcionalmente.
2 x		LIA Bandeja Ensaio 10 Poços
1 x		Ficha de Relatório/Classificação

Símbolos utilizados nos rótulos:

	Número de lote
	Número de catálogo
	Utilização diagnóstica <i>in vitro</i>
	Utilização por
	Temperatura de armazenamento
	Consulte as instruções de utilização
	Número de testes
	Fabricante
	Data de fabricação

Materiais necessários mas não fornecidos

- Cilindro graduado limpo de 1000 ml
- Pinça sem serrilha (Filter forceps)
- Agitador ou misturador de plataforma giratória
- Papel absorvente ou toalhetes de papel
- Água desionizada ou destilada
- Frascos de esguicho para o tampão de lavagem diluído ou água destilada
- Pipetas com capacidade de liberação de 10 a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Temporizador

REAGENTES

Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C; **não congele.**

Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (18 a 25 °C) e misturados cuidadosamente antes da utilização. Não utilizar se o reagente não estiver límpido ou na presença de precipitado insolúvel. Após a reconstituição, os reagentes ficam estáveis até à data de validade indicada quando armazenados entre 2 a 8 °C e protegidos de contaminação, salvo de outro modo indicado abaixo:

- As tiras de teste revestidas de antigénio **STRIP|HSP70|LIA** estão prontas a ser utilizadas. Deixe que o saco de tiras de teste atinja a temperatura ambiente antes da abertura, a fim de evitar a condensação e a deterioração associada. Volte a embalar as tiras de teste não utilizadas, armazenando-as entre 2 a 8 °C em local escuro e seco.
- O **Diluyente de Amostra** está pronto a ser utilizado **SAMPLE|DIL**. O diluyente de amostra é estável durante o mínimo de 8 semanas quando armazenado de modo adequado e protegido de contaminação microbiana ou química.
- Reconstituir 1 parte **BUF|WASH|LIA** em 19 partes de água destilada ou desionizada para resultar em 1 litro de **Tampão de Lavagem**. O Tampão de Lavagem é estável durante o mínimo de 8 semanas após a reconstituição quando armazenado de modo adequado e protegido de contaminação microbiana.
- O **CONJ|LIA** e o **SUBSTRATE** são estáveis durante o mínimo de 8 semanas após a abertura quando armazenados de modo adequado e protegidos de contaminação microbiana. O **SUBSTRATE** é sensível à luz e deve ser armazenado na garrafa de cor âmbar fornecida.

As tiras de antigénio só podem ser utilizadas uma vez. Não troque os componentes de lotes diferentes. Não utilize reagentes após a data de validade indicada nos rótulos.

PT Precauções

Todos os componentes de origem humana usados foram testados para HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram resultado negativo pelos testes exigidos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e as amostras dos doentes devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Siga as boas práticas de laboratório em relação à conservação, distribuição e eliminação dos materiais acima mencionados.¹⁰

AVISO – O Proclin 300 é um conservante. Após a eliminação de líquidos que contenham Proclin 300, lavar com água abundante para diluir os componentes abaixo dos níveis ativos.

Para garantir resultados válidos devem ser rigorosamente cumpridas as instruções descritas neste folheto informativo do kit. Não trocar os componentes do kit por outros de origens diferentes. Respeite as normas laboratoriais em vigor para reduzir a possibilidade de contaminação microbiana ou cruzada dos reagentes durante o manuseamento. Não usar os componentes do kit após a data de validade indicada no rótulo.

COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras com hemólise bruta, lípidos elevados ou contaminação microbiana podem interferir com o desempenho do teste, pelo que não devem ser utilizadas. Conserve as amostras entre 2 °a 8 °C por um período máximo de uma semana. Para uma conservação mais prolongada, as amostras de soro devem ser congeladas. Recomenda-se que as amostras congeladas sejam testadas no prazo de um ano. Evite congelar e descongelar as amostras repetidamente.

PROCEDIMENTO

Notas sobre o procedimento

- Antes de iniciar o teste leia atentamente o Folheto do Produto
- Deixe que as amostras de soro e os reagentes do teste alcancem a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos antes de iniciar o procedimento de teste. Volte a guardar imediatamente todas as amostras e os reagentes no frigorífico após a utilização.
- Uma técnica adequada de lavagem é fundamental para o desempenho satisfatório do ensaio.
- Manipule as tiras de teste exclusivamente com pinças esterilizadas ou luvas. Evite tocar nas zonas brancas de nitrocelulose.
- As linhas de teste são colocadas acima do (consulte o Esquema da Figura 1) corte, as linhas de controlo do soro e do conjugado conforme descrito no esquema. As linhas de controlo do soro e do conjugado aparecem na mesma porção de nitrocelulose na parte inferior.
- Atribuir números de identificação de amostras às tiras respetivas no Formulário de Relatório. Cada tira possui um número de tira e um número de lote impresso na parte posterior para rastreabilidade.
- Preencha toda a outra informação relevante no Formulário de Relatório antes de iniciar o ensaio.

Método do Teste

Passo 1 Utilizando luvas ou uma pinça romba, retire a película do número necessário de tiras. Deve ter-se o cuidado de não tocar nas zonas revestidas de nitrocelulose com as mãos desprotegidas ou com pinças pontiagudas.

Passo 2 Colocar o número necessário de tiras **STRIP|HSP70|LIA** com o lado rotulado para cima nos poços individuais da bandeja do ensaio.

Passo 3 Pipetar 1,5 ml de Diluente de Amostra **SAMPLE|DIL** em cada poço, certificando-se que as tiras ficam completamente submersas no líquido.

Passo 4 Incubar as tiras do Diluente de Amostra **SAMPLE|DIL** no mínimo durante 10 minutos. A linha de controlo azul começa a desaparecer à medida que a membrana ficar molhada.

Passo 5 Pipetar 15 µl de soro ou amostra de controlo nos poços adequados para obter uma diluição 1:101. Incubar durante 60 minutos (±5 min.) a temperatura ambiente num agitador ou misturador giratório.

Passo 6 LAVAR: Aspirar a solução de amostra para um recipiente de resíduos. Lavar cuidadosamente as tiras com Tampão de Lavagem **BUF|WASH|LIA**, esguichando cerca de 2 ml de solução diretamente sobre as tiras. Lave as tiras com agitação suave durante 5 minutos e aspire a solução para um recipiente de resíduos. Repita a lavagem mais duas vezes. Advertência: Concluir a lavagem das tiras entre incubações é fundamental para obter resultados válidos. A lavagem imprópria resultará em elevada coloração de fundo. Não permitir que as tiras sequem em qualquer passo durante o ensaio.

Passo 7 Pipetar 1,0 ml de conjugado **CONJ|LIA** em cada poço. Incubar durante 30 minutos (±5 min.) a temperatura ambiente num agitador ou misturador giratório.

Passo 8 Repetir o Passo 6.

PT

Passo 9 Pipetar 1,0 ml [SUBSTRATE] em cada poço e incubar com agitação suave durante 10 minutos a temperatura ambiente e luz reduzida. As linhas de controlo do soro e conjugado desenvolvem uma cor intensa após a incubação no substrato. O corte da linha de controlo desenvolve-se numa linha negativa fracamente colorida após a incubação.

Passo 10 Para parar a reação, lave as tiras 2x com água destilada/desionizada, esguichando aproximadamente 2 ml de água diretamente sobre as tiras seguido de aspiração. Não molhar/lavar durante mais de 10 minutos, pois isto pode resultar num decréscimo da sensibilidade das linhas coloridas desenvolvidas.

Passo 11 Utilizando uma pinça romba, remova as tiras da bandeja de ensaio e coloque-as suavemente sobre papel absorvente, deixando-as secar. Deixe que as tiras sequem antes de analisar ou de as colocar na folha de relatório/classificação.

Controlo de Qualidade

Controlos Procedimentais: Cada tira possui três controlos procedimentais para a adição de soro e conjugado e uma linha de corte para determinar as reações fracas ou negativas.

Os controlos Positivo e Negativo estão disponíveis como componentes opcionais e podem ser executados para controlo de qualidade adicional.

Espera-se que os laboratórios individuais otimizem o tempo de desenvolvimento do substrato em +/-2 minutos com base no processador de amostras ou nos métodos utilizados. Sugere-se que a linha de corte seja uma linha esbatida após as incubações com o substrato. Uma linha de corte invisível ou demasiado forte sugere a otimização do tempo de desenvolvimento do substrato para as condições de execução dadas.

Interpretação

As tiras de teste contêm linhas de controlo na parte inferior e uma linha de teste acima dos controlos. A extremidade inferior da tira de teste (perto do número de série) possui três linhas de controlo: a linha de corte, a linha de controlo de soro e a linha de controlo do conjugado do topo até à base. O corte permite ao técnico determinar o resultado do teste como positivo, negativo ou indeterminado (+/-). As duas linhas de controlo do procedimento garantem a adição de amostra, conjugado e substrato.

Compare a reação da linha de teste com as dos controlos. A utilização de uma lente de aumento pode ajudar na observação de reações fracas.

- Conforme rotulado na Figura 1, as linhas de controlo do soro e do conjugado devem ser claramente positivas, indicando uma experiência bem-sucedida. O corte é uma linha fraca com variação de intensidade com base nas condições experimentais. O esquema da Figura 1 demonstra o exemplo de uma linha de teste e de 3 linhas de controlo. O desenvolvimento da linha de teste depende da amostra. As reações positivas podem ocorrer em intensidades variáveis, de fraca a forte. **As reações fracas devem ser comparadas com a intensidade da linha de corte fornecida na tira.** As reações que são nitidamente mais escuras ou densas do que a intensidade da linha de corte devem ser consideradas positivas.
- As tiras podem apresentar um fundo homogéneo ou descolorado devido a diversos fatores interferentes no soro lipémico ou hemolítico. Este efeito também pode ser observado se as tiras de teste não forem suficientemente bloqueadas ou caso as mesmas tenham secado acidentalmente durante o ensaio.
- No caso de reações fracas positivas e negativas, a reação da intensidade da linha deve ser comparada com a linha de corte para determinar o resultado como negativo (intensidade mais fraca do que a linha de corte) ou não conclusivo (+/-). Indistinguível da linha de corte).
- As tiras secas podem ser montadas na folha de relatório/classificação fornecida. A aba de plástico de proteção está permanentemente fixa à folha de relatório na borda esquerda. Retire cuidadosamente a película da aba de plástico do lado direito para o lado esquerdo, conforme a página de um livro. Coloque as tiras reagidas na fita adesiva na ranhura respetiva e volte a cobrir a aba de plástico de volta no lugar. A aba de plástico de proteção foi concebida para ser reutilizada para múltiplas sessões de experiências e as tiras podem ser montadas nas ranhuras respetivas. O técnico pode utilizar o formulário para registar os números de lote dos reagentes utilizados, o número da amostra e os resultados/comentários.

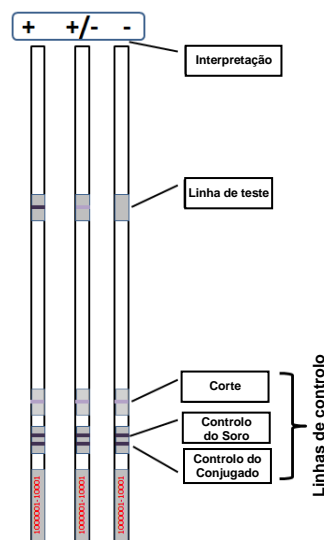


Figura 1: Esquema das tiras LIA reagidas com uma linha de teste.

Figura 2: Esquema da Folha de Relatório

PT LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Neste procedimento só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou com contaminação microbiana podem interferir com o desempenho do teste e, portanto, não devem ser utilizadas. Não armazene as amostras entre 2 a 8 °C por um período superior a uma semana. Para uma conservação mais prolongada, as amostras de soro devem ser congeladas. Evite congelar e descongelar as amostras repetidamente.

O Imunoensaio de Linha para Confirmar a Presença de Anticorpos Anti-68 kD (hsp-70) deve ser utilizado como uma ajuda ao diagnóstico. Os resultados positivos podem ser encontrados noutras condições autoimunes ou em determinadas doenças infecciosas. Deste modo, os resultados devem ser avaliados e interpretados por uma autoridade médica, tendo em conta o historial clínico do paciente e outros resultados laboratoriais. Alguns soros podem reagir ocasionalmente ao marcador MW, cujo significado não é conhecido.

VALORES PREVISTOS

Os anticorpos contra o 68 kD (hsp-70) ocorrem em pacientes com SNHL ativa idiopática e as titragens de anticorpos são mostradas para correlação com a atividade da doença.

Anticorpos Anti-68 kD (hsp-70) em Pacientes com SNHL Idiopática Bilateral¹¹

Grupo de Doenças	N.º Testado	N.º Positivo	% Positivo
IPBSNHL	72	42	58
Otosclerose	11	0	0
Síndrome de Cogan	8	0	0
Indivíduos normais	53	1	2

Correlação da Reatividade dos Anticorpos Anti-68 kD (hsp-70) com a Atividade da Doença¹¹

Atividade da Doença	Anticorpos Anti-68 kD
Ativos	89%
Inativos	0%

Um estudo realizado por terceiros sobre 34 pacientes com perda de audição rapidamente progressiva demonstrou que o anti-rhsp-70 OTOBlot tinha 42% de sensibilidade, 90% de especificidade e 91% de valor preditivo positivo para previsão da resposta aos esteróides.¹²

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade do Imunoensaio de Linha para Confirmar a Presença de Anticorpos Anti-68 kD (hsp-70) ImmuStripe™ foi avaliada através de testes a amostras bem caracterizadas de pacientes com SNHL, pacientes com perda de audição idiopática, controlos de doenças e amostras de soro humano “normal”. Estes resultados são seguidamente resumidos.

		Estado Clínico		
		Positivo	Negativo	Total
68 KD (hsp-70)	Positivo	36	2	38
	Negativo *	14	79	93
LIA	Total	50	81	131
Sensibilidade:		72,0%		
Especificidade:		97,5%		
Acordo Clínico:		87,8%		

* As amostras indeterminadas foram consideradas negativas.

Indivíduos com SNHL/ Perda de Audição Idiopática: 50

Controlos de Doenças: 33

Indivíduos Saudáveis Normais: 48

Reprodutibilidade

Os ensaios das amostras na série negativa, não conclusiva e positiva foram realizados para determinar a reprodutibilidade qualitativa de teste para teste e de operador para operador. Os resultados produziram um acordo qualitativo de 100%.

PT
Reatividade Cruzada

Os controlos de doenças autoimunes foram reagidos para testar a potencial reatividade cruzada dos ensaios, incluindo das populações de pacientes seguintes: doença celíaca (5), doença do tecido conjuntivo positiva para anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis (12), tiroidite de Hashimoto (6), artrite reumatoide (5), e lúpus eritematoso sistémico (5). Uma amostra de artrite reumatoide teve um resultado positivo, produzindo um valor positivo de 3,3% nesta população.

Interferência

A interferência foi estudada misturando o soro com resultados conhecidos de anticorpos 68 kD (hsp-70) com amostras de soro potencialmente interferentes e estudando o desvio dos resultados previstos. Não foi demonstrada qualquer interferência significativa que influenciasse os resultados positivos para as substâncias seguintes nos níveis indicados: hemoglobina (2 g/L), bilirrubina (342 μ mol/L), triglicéridos (25 mg/ml) e Fator Reumatoide (100 EU/ml).

REFERENCES

1. McCabe BF. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol.* 1979; 88:5852-589.
2. Arnold W, Pfaltz R, Alternatt HJ. Evidence of serum antibodies against inner ear tissues in the blood of patients with certain sensorineural hearing disorders. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1985; 99:437-444.
3. Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope.* 1990; 100:516-524.
4. Yamanobe S, Harris JP. Inner ear-specific autoantibodies. *Laryngoscope.* 1993; 103:319-325.
5. Shin S, Billings P, Keithley EM, Harris JP. Comparison of anti-heat shock protein 70 (anti-shp-70) and anti-68-kD inner ear protein in the sera of patients with meniere's disease. *Laryngoscope.* 1997; 107:222-227.
6. Harris JP and Aframian D. Role of autoimmunity in contralateral delayed endolymphatic hydrops. *Am J Otol.* 1994; 15:710-716.
7. Gottschlich S, Billings P, Keithley EM et al. Assessment of serum antibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss and meniere's disease. *Laryngoscope.* 1995; 105:1347-1352.
8. Billings PB, Keithley EM, Harris JP. Evidence linking the 69 kilodalton antigen identified in progressive sensorineural hearing loss patient sera with heat shock protein 70. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995; 104:181-188.
9. Sismanis A, Thompson T, Willis HE. Methotrexate therapy for autoimmune hearing loss: a preliminary report. *Laryngoscope.* 1994; 104:932-934.
10. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1993 [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395].
11. Moscicki RA, San Martin JE, Quintero CH et al. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss – correlation with disease activity and response to corticosteroid treatment. *JAMA.* 1994; 272:611-616.
12. Hirose K, Werner MH, and Duckert LG. Utility of laboratory testing in autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope.* 1999; 109:1749-1753.

For technical assistance please contact:



immco DIAGNOSTICS, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120 USA
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: (800) 537-TEST
E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands