



INSTRUCCIONES DE USO

CHORUS SS-A

Para la determinación semicuantitativa de anticuerpos anti-SS-A/Ro60

Sólo para el uso diagnóstico *in vitro*

1. INDICACIONES

Método inmunoenzimático para la determinación semicuantitativa de anticuerpos anti-SS-A en suero humano con dispositivo desechable aplicado a los equipos Chorus y Chorus TRIO.

2. INTRODUCCIÓN

SS-A es una partícula de proteína y RNA (ribonucleoproteína, RNP), distribuida ubicuamente en todos los tejidos. Está compuesta de dos proteínas (60 kDa y 52 kDa) asociada con al menos cuatro pequeños RNA citoplasmáticos y ricos en uridina (hyRNA, RNA citoplasmático humano) cuya función es aún desconocida.

Los autoanticuerpos contra SS-A (antiguamente denominados Ro después del paciente prototipo Robert) así como los contra SS-B (antiguamente denominados La después del paciente prototipo Lane) son marcadores típicos para el síndrome de Sjögren (SS) y el lupus eritematoso sistémico (LES), ambas son enfermedades autoinmunes sistémicas de etiología desconocida y predominancia en mujeres.

El síndrome de Sjögren es una enfermedad que afecta a la glándulas exocrinas como las glándulas salivares y lacrimales. La inflamación crónica dominada por células plasmáticas provoca un proceso de pérdida de la función de estas glándulas descrito como síndrome de Sicca. El diagnóstico de SS se basa en el análisis de la pérdida de función secretora en el ojo y en las glándulas salivares y en la detección de anticuerpos anti-SS-A y anti-SS-B.

Los anticuerpos contra ambas proteínas SS-A se encuentran en el 70-80% de los pacientes con SS primario, y el 40-94% de esos pacientes muestran anticuerpos adicionalmente contra el antígeno SS-B/La. Los anticuerpos SS-A se dan en el 25-40% de los pacientes con LES y ANA-positivo (ANA: anticuerpos anti-nucleares), y también en solitario en el 65% de los pacientes LE cutáneo subagudo. Ambos anticuerpos anti SS-A y anti-SS-B están asociados con el bloqueo cardíaco congénito. La detección aislada de anticuerpos SS-A de 52kDa, sin el antígeno de 60kDa, se da más a menudo en el SS, así como en el LE ANA-negativo y con una frecuencia del 95% en el LE neonatal.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El dispositivo SS-A es listo para su uso para la detección de los anticuerpos anti SS-A/Ro60, en los equipos CHORUS. El test se basa en la técnica ELISA

El antígeno, elevadamente purificado, está unido a la fase sólida. Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.

Después de varios lavados para eliminar las proteínas que no han reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas conjugadas con peroxidasa de rábano.

El conjugado que no se ha unido es eliminado y se añade el sustrato cromogénico de la peroxidasa (TMB).

El color azul que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

Los dispositivos desechables contienen todos los reactivos para realizar la prueba cuando se utilizan con los equipos Chorus.

Los resultados están expresados en unidades arbitrarias (UA/ml).

4. PRECAUCIONES

PARA USO EXCLUSIVO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y dieron resultados negativos en métodos para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una completa garantía sobre la ausencia de agentes infecciosos, cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las normas comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

Desecho de los residuos: las muestras de suero, los calibradores y las tiras utilizadas se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, de acuerdo con las disposiciones normativas vigentes.

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por vía oral.
2. Usar los guantes desechables y la protección para los ojos al manipular las muestras y durante la prueba.
3. Lavar las manos a fondo después de terminar la prueba.
4. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
 - a) El conjugado y los controles contienen fenol
 - b) El sustrato es ácido
 Si cualquier reactivo entrara en contacto con la piel u ojos, lavar con agua abundante
5. Los ácidos neutralizados y otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1.0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.

6. El vertido de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada debe ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de continuar con el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en vertidos que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada. Todos los materiales utilizados para limpiar vertidos, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso; utilizar en 60 minutos.

1. **Descartar los dispositivos con substrato (pocillo 4) de color azul**
2. Añadiendo la muestra al pocillo, comprobar que esté bien distribuida en el fondo.
3. Comprobar la presencia de los reactivos en el dispositivo y que éste no esté dañado, no utilizar dispositivos en los que falte algún reactivo.
4. Los dispositivos se deben utilizar junto con el equipo Chorus, siguiendo rigurosamente las Instrucciones de Uso y el Manual del Usuario.
5. Comprobar que las opciones del equipo Chorus sean correctas (ver Manual del Usuario Chorus).
6. No modificar el código de barras colocado en la asa del dispositivo a fin de garantizar la lectura correcta.
7. Evitar el uso de congeladores autodescongelantes para la conservación de las muestras.
8. Los códigos de barras dañados se pueden colocar en el equipo manualmente.
9. No exponer los dispositivos a luz intensa ni a humos de hipoclorito durante su conservación y/o uso.
10. El uso de muestras altamente hemolizadas, o que presenten contaminación microbiana puede ser fuente de error.
11. Antes de colocar el dispositivo en el equipo Chorus comprobar que el pocillo de reacción no contenga partículas extrañas.
12. Pipetear el suero (50 µl) en el pocillo 1 del dispositivo (ver dibujo).
13. No utilizar el suero después de la fecha de caducidad.
14. **Comprobar que el aparato esté conectado con la Washing buffer Autoimmunity REF 86004.**

5. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Reactivos suficientes para 36 determinaciones (REF 86018).

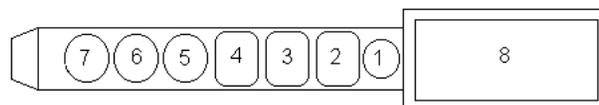
Reactivos suficientes para 12 determinaciones (REF 86018/12).

DD DISPOSITIVOS

6 envases con 6 dispositivos cada uno (REF 86018).

2 envases con 6 dispositivos cada uno (REF 86018/12).

Descripción:



Posición 8: Espacio para etiquetas con código de barras

Posición 7: libre

Posición 6: POCILLO DE MICROPLACA

Sensibilizado con SS-A-Ro60 altamente purificado.

Posición 5: POCILLO

No sensibilizado.

Posición 4: SUBSTRATO TMB 0.35 ml

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3.8)

Posición 3: DILUYENTE PARA MUESTRAS 0.35 ml

Contenido: Solución proteica con Tween-20 al 0.2% y Proclin al 0.1%.

Posición 2: CONJUGADO 0.35 ml

Contenido: anticuerpos monoclonales anti-IgG humanos marcados con peroxidasa, en una solución tampón fosfato con fenol al 0.05% y Bronidox al 0.02%.

Posición 1: POCILLO LIBRE

Donde el usuario dispensa el suero sin diluir.

Uso: equilibrar un envase a temperatura ambiente, abrir el envase y retirar los dispositivos necesarios; colocar los dispositivos no utilizados en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y **cerrar** presionando el cierre. Conservar a 2/8°C.

CALIBRATOR CALIBRADOR 1 x 0.175 ml

Contenido: Suero humano diluido que contiene anticuerpos IgG anti-SS-A y conservante. Líquido, listo para su uso.

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1 x 0.425 ml

Contenido: Suero humano diluido que contiene anticuerpos IgG anti-SS-A y conservante. Líquido, listo para su uso.

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- WASHING BUFFER AUTOIMMUNITY (REF) 86004
- CLEANING SOLUTION 2000 (REF) 83609
- SANITIZING SOLUTION (REF) 83604 - 83608
- SAMPLE DILUENT/NEGATIVE CONTROL (REF) 83607
- Agua destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 50-200 µl
- Guantes desechables
- Solución de hipoclorito de sodio (5%)
- Envases para la recogida de materiales potencialmente infecciosos

6. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. En caso de una errónea temperatura de conservación, la calibración debe ser repetida y la validez del resultado debe ser verificada por medio del suero de control (ver capítulo 9, Validación de la prueba)

La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja.

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la apertura y/o preparación.

DISPOSITIVOS	8 semanas a 2/8°C
CALIBRADOR	8 semanas a 2/8°C
CONTROL POSITIVO	8 semanas a 2/8°C

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

La muestra consta de suero extraído de la vena de forma común y debe manipularse siguiendo las precauciones dictadas por la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar a 2/8°C durante 4 días; para conservaciones más largas congelar a -20°C. La muestra se puede descongelar hasta un máximo de 3 veces. No deben ser utilizados congeladores autodescongelantes para la conservación de la muestra. Después de descongelar, agitar con cuidado antes de su uso. La inactivación térmica puede dar resultados erróneos. La calidad de la muestra puede verse seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.

No utilizar muestras muy lipémicas, ictericas o contaminadas. El test no puede aplicarse al plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

1. Abrir el envase (por el lado del cierre a presión), retirar los dispositivos necesarios para ejecutar las pruebas y conservar los otros en el envase, extraer el aire y cerrar presionando el cierre.
2. Comprobar visualmente el estado del dispositivo según las indicaciones del capítulo 4 Precauciones Analíticas.
3. Dispensar 50 µl de suero no diluido en el pocillo n°1 de cada dispositivo, por cada cambio de lote utilizar un dispositivo para el calibrador.
4. Colocar los dispositivos en el equipo Chorus. Ejecutar la calibración (si fuera necesario) y el test según indicaciones del Manual del Usuario Chorus.

9. VALIDACIÓN DE LA PRUEBA

Utilizar el suero de control para verificar la validez del resultado obtenido, procesándolo según indicaciones del Manual del Usuario del equipo. Si el equipo indica que el suero de control tiene un valor fuera de los límites de aceptabilidad, es necesario realizar de nuevo la calibración. Los resultados previos se corregirán automáticamente.

Si el resultado del suero de control continúa estando fuera del rango de aceptabilidad, contactar con Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
 Fax: 0039 0577 366605
 email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El equipo Chorus proporciona un resultado en AU/ml calculado según un gráfico lote-dependiente grabado en el equipo.

La prueba puede ser interpretada como sigue:

POSITIVO cuando el resultado es > 18.0 AU/ml
 NEGATIVO cuando el resultado es < 12.0 AU/ml
 DUDOSO/EQUIVOCO cuando el resultado es entre 12.0 y 18.0 AU/ml

En caso de un resultado dudoso se aconseja repetir la prueba. Si el resultado continúa siendo dudoso, tomar una nueva muestra.

11. LIMITACIONES

Todos los resultados positivos de la prueba necesitan ser cuidadosamente interpretados.

Este Test no debe ser la única prueba utilizada par el diagnóstico clínico. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección.

El resultado de la prueba debe ser evaluado junto con los datos clinicos y otros procedimientos de diagnóstico.

12. RANGO DE CALIBRACIÓN

Rango de calibración 3.0-100.0 AU/ml.

Para muestras >100.0 AU/ml repetir la prueba y prediluir la muestra en Negative Control Sample Diluent (PF83607 – no suministrado con el kit).

13. VALORES DE REFERENCIA

Los valores esperados en la población normal, determinados mediante la prueba de 120 sueros de donantes sanos, oscilaron entre 3.0 y 11.1 AU/mL.

14. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

5 muestras fueron analizadas (2 negativos, 1 a Cut Off y 2 positivas) a las cuales se añadieron los interferentes siguientes:

Factor reumatoide (44 - 220 UI/ml)
 Bilirrubina (4.5 mg/dl - 45 mg/dl)
 Triglicéridos (10 mg/dl - 250 mg/dl)
 Hemoglobina (5 mg/ml - 30 mg/ml)

La presencia en el suero de las sustancias interferentes arriba mencionadas no afecta el resultado del test.

15. REACCIONES CRUZADAS

Se han probado muestras positivas a PR-3, MPO, Cardiolipin, Gliadin, AMA-M2, Transglutaminasa, SS-B, Sm, Scl-70, Cenp-B, Jo-1, U1-70, snRNP, dsDNA IgG y ASCA.

No se encontraron reacciones cruzadas significativas.

16. ESTUDIOS DE COMPARACIÓN

En una prueba 131 muestras fueron analizadas con kit Diesse y con otro método comercial.

A continuación se muestran los datos de la prueba:

		Referencia		
		+	-	Total
Diesse	+	31	1	32

	-	0	99	99
	Total	31	100	131

Percent Positive Agreement (~Sensibilidad de Diagnóstico):

100.0% CI_{95%}: 89.0-99.9

Percent Negative Agreement: (~Especificidad de Diagnóstico):

99.0% CI_{95%}: 94.5-99.8

El grado de concordancia entre los dos métodos resulta excelente y con un valor de K (Coeficiente de Cohen) de 0.97.

17. REPRODUCIBILIDAD

Muestra	INTRA-ENSAYO		ENTRE ENSAYOS	
	Media (AU/ml)	CV%	Media (AU/ml)	CV%
1	4.5	6.2	4.1	9.3
2	3.9	5.9	3.3	9.4
3	10.9	7.0	8.7	9.2
4	11.0	6.9	10.9	5.5
5	14.1	6.8	13.9	6.8
6	16.8	3.5	14.8	5.9
7	25.6	9.1	24.8	7.4
8	43.1	8.6	42.6	7.8
9	125.5	7.0	114.6	7.8
10	141.6	9.1	123.6	8.7

Muestra	ENTRE LOTES		ENTRE EQUIPOS	
	Media (AU/ml)	CV%	Media (AU/ml)	CV%
1	4.3	3.5	4.3	-
2	3.8	5.5	3.8	2.6
3	10.5	1.1	10.5	2.5
4	10.8	3.0	10.7	0.6
5	13.3	4.5	13.3	4.2
6	15.1	7.1	15.1	1.7
7	26.5	5.3	26.5	2.8
8	41.9	6.5	41.9	3.2
9	130.0	5.1	130.0	0.8
10	121.8	2.0	121.8	2.3

18. BIBLIOGRAFÍA

1. Itoh Y. and Reighlin M. (1992) Autoimmunity 14: 57-65.
2. Kalden JR (1988) In: Klinische Rheumatologie. Springer Verlag, Berlin.
3. Harley JB (1998) J. Autoimmun. 2 : 383-394.
4. Slobbe RL et al : (1991) Clin. Exp. Immunol. 86 : 99-105.