



# 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.<sup>1,2</sup> El laboratorio trabaja para identificar estos casos que deben incluir pruebas de anticuerpo sérico contra antígeno 68 kD (hsp-70) del oído interno.<sup>3-8</sup> 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.<sup>7</sup> 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.<sup>9</sup>

## 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:



Número de lote



Número de catálogo



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 **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.<sup>10</sup>

**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 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

## ES

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.

- 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.

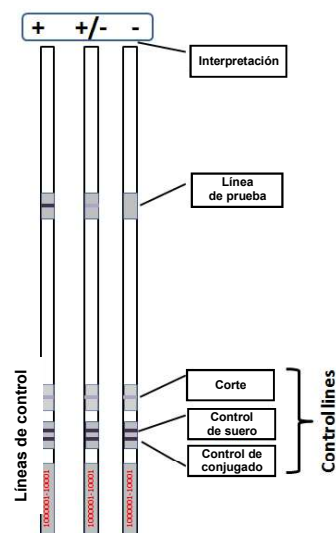


Figura 1: Esquema de las tiras LIA de reacción con una línea de prueba.

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 periodos 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 idiopática<sup>11</sup>*

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 enfermedad<sup>11</sup>*

##### 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.<sup>12</sup>

### 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
<b>68 KD</b>	Positivo	36	2	38
	Negativo*	14	79	93
<b>LIA</b>	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), reumatoide crónica (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  $\mu\text{mol/L}$ ), triglicéridos (25 mg/ml) y factor reumatoide (100 EU/ml).