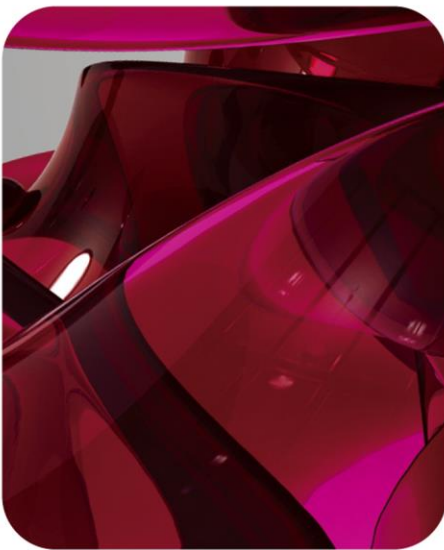




AESKU. DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUBLOTS[®]
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKUBLOTS[®] Vasculitis Pro
Ref 4002

Manual de Instruções

Conteúdo

1	Utilização	1
2	Aplicações clínicas e princípio do ensaio	1
3	Componentes do Kit	2
4	Armazenamento e validade	2
5	Avisos e medidas de precaução	3
6	Recolha da amostra, manipulação e armazenamento	4
7	Procedimento do teste	4
8	Interpretação qualitativa.....	7
9	Dados Técnicos	7
10	Dados do teste / Características do teste.....	8
11	Bibliografia	8



Ref. do produto	4002
Desc. do produto	Vasculitis Pro
N.º Rev. do Manual	006 : 2016-11-07

1 Utilização

AESKUBLOTS® Vasculitis Pro é um imunoensaio enzimático baseado em membrana para detecção qualitativa de anticorpos IgG contra PR3, MPO e GBM em soro humanos. Os antígenos estão localizados como linhas paralelas em posições definidas de forma exata numa membrana de nitrocelulose.

O ensaio é uma ferramenta no diagnóstico diferencial de vasculite autoimune.

2 Aplicações clínicas e princípio do ensaio

Os anticorpos contra mieloperoxidase (MPO) e proteinase 3 (PR3) pertencem ao grupo de anticorpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) que são direcionados contra componentes citoplásmicos e granulócitos e monócitos neutrofílicos. Os ANCA são marcadores importantes para o diagnóstico diferencial de vasculite autoimune. Os anticorpos anti-PR3 são um marcador serológico específico para Granulomatose com Poliangiite (doença de Wegener) e pode ter um papel ativo na patogénese de Wegener. Os títulos de anticorpos anti-PR3 são fortemente associados com a atividade da doença e inibem a atividade proteolítica do PR3. Os anticorpos anti-MPO estão correlacionados com vasculite idiopática ou glomeronefrite crescêntica necrosante associada com vasculite e são encontrados frequentemente em 70 % dos pacientes com poliangiite microscópica e em 5 a 50 % dos pacientes com síndrome de Churg-Strauss.

Hoje, a determinação de anticorpos a circular contra a membrana basal glomerular (GBM) é serologia de ponta para o diagnóstico da síndrome de Goodpasture. Este distúrbio autoimune dos rins tem o nome de Ernest Goodpasture, que foi o primeiro a descrever a coexistência de uma hemorragia fatal dos pulmões com glomerulonefrite progressiva.

Princípio do teste

Os antígenos são aplicados como linhas na membrana de nitrocelulose. A membrana está bloqueada para evitar reações não específicas. As tiras de membrana com antígenos específicos em posições definidas de forma exata são incubadas em amostras de soro diluído 1:101. Os anticorpos do paciente, se presentes na amostra, ligam-se ao antígeno. A parte não ligada é eliminada na etapa seguinte. Em seguida, as imunoglobulinas anti-humanas conjugadas com peroxidase de rábano (conjugado) são incubadas e reagem com o complexo antígeno-anticorpo das amostras. O conjugado não ligado é eliminado na etapa seguinte. Depois de adicionar o substrato de TMB, este é convertido em precipitado azul através de uma reação enzimática. A reação para com água destilada.

3 Componentes do Kit

DILUIR ANTES DE USAR				
Item	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição/Conteúdo
Reagente de Bloqueio	3 x para 10 ml de Concentrado cada	branco	N/A	Leite em pó seco magro para preparação de 3 x 10 ml de tampão de amostra
Tampão de lavagem (20x)	1 x 50 ml	branco	incolor	20x concentrado para preparação de 1 L tampão Tris, pH 6,9 ± 0,2
PRONTO A USAR				
Item	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição/Conteúdo
Conjugado, IgG	1 x 10 ml	azul	incolor	Imunoglobulina anti-humana G (IgG) conjugada com peroxidase de rábano
Substrato TMB	1 x 10 ml	preto	incolor	TMB/H ₂ O ₂ Estabilizado
Tiras de membrana	24 tiras	codificação de cor: roxo	N/A	Antígenos revestidos ver Utilização prevista
pinças, modelo de referência, ficha de resultados, tira adesiva (lados duplos, preta)	1 pç. cada	N/A	N/A	N/A
câmara de incubação	3 pçs.	N/A	N/A	N/A
Etiquetas para tampão de amostra	3 pçs.	N/A	N/A	N/A
MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS				
<p>plataforma de oscilação, cilindro de 1000 ml, pipeta ou cilindro para 10 ml, pipetas de precisão (10, 1000 µl), papel absorvente ou de filtro. Os nossos testes foram concebidos para utilização com água purificada segundo a definição da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP 26 – NF 21) e da Farmacopeia Europeia (Eur.Ph. 4.ª ed.).</p>				

4 Armazenamento e validade

Todos os reagentes e tiras de membrana devem ser armazenados nas suas embalagens originais a 2-8 °C/35-46 °F. Depois de preparados, as soluções reconstituídas são estáveis durante 6 semanas a 2-8 °C/35-46 °F. Os reagentes e as tiras devem ser utilizados apenas dentro do prazo de validade indicado em cada componente. Não utilize componentes depois das datas de validade. Evite a exposição intensa da solução TMB à luz.

5 Avisos e medidas de precaução

5.1 Risco para a saúde

Este produto destina-se apenas a utilização para DIAGNÓSTICO IN VITRO. Desta forma, apenas pessoal com formação e especialmente treinado em métodos de diagnóstico in vitro pode executar o kit. Apesar de este produto não ser considerado como particularmente tóxico ou perigoso quando se respeitam as condições de utilização, consulte o seguinte para máxima segurança:

Recomendações e medidas de precaução

Este kit contém componentes potencialmente perigosos. Apesar dos reagentes do kit não estarem classificados como sendo irritantes para os olhos e a pele, recomendamos que evite o contacto com os olhos e a pele e use luvas descartáveis.

O substrato contém kathon (1% v/v) como conservante. Não deve ser ingerido nem deve entrar em contacto com a pele ou membranas mucosas.

Não fume, coma ou beba ao manusear o kit. Não utilize a pipeta com a boca.

Manuseie as amostras do paciente como se fossem capazes de transmitir doenças infecciosas, e em conformidade com os requisitos nacionais.

5.2 Avisos gerais

Para diferenciar entre os vários testes **AESKUBLOTS®** disponíveis, aplica-se uma codificação de cor acima da linha de referência das tiras:

Codificação de cor	AESKUBLOTS®
amarelo	ANA-12 Pro
laranja	ANA-17 Pro
azul	Myositis Pro
castanho	Liver Pro
roxo	Vasculitis Pro
preto	Gastro Pro
verde	Borrelia-G and Borrelia-M

Caso as informações sobre o produto, incluindo a rotulagem, estejam incorretas, contacte o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

O Reagente de Bloqueio e o tampão de lavagem podem ser trocados entre lotes e kits de teste. Todos os restantes componentes são específicos para cada kit de teste e não podem ser trocados. Não troque os componentes do reagente entre os testes de diagnóstico de autoimunidade e borrelia!

Para manusear conjugado, não utilize recipientes de poliestireno.

Permita que todos os componentes atinjam a temperatura ambiente (20-32 °C/68-89,6 °F) antes da utilização, misture bem e siga o esquema de incubação recomendado para um desempenho ideal do teste.

Nunca exponha componentes a uma temperatura superior a 37 °C/ 98,6 °F.

Pipete sempre a solução de substrato apenas com seringas completamente novas. Proteja este reagente da luz. Nunca pipete conjugado com seringas utilizadas anteriormente com outros reagentes.

Ref. do produto	4002
Desc. do produto	Vasculitis Pro
N.º Rev. do Manual	006 : 2016-11-07

A intensidade da cor da banda não se correlaciona necessariamente com títulos de anticorpos obtidos com outras metodologias de referência.

As amostras de doadores de sangue aparente normal podem conter auto-anticorpos.

Se a amostra do paciente contém níveis elevados de complexos imunes ou outros agregados de imunoglobulina, resultados positivos falsos através de ligação não específica não podem ser excluídos.

Um diagnóstico clínico definitivo não deve basear-se apenas nos resultados do teste executado, mas deve fazer-se pelo médico após avaliação de todos os resultados clínicos e laboratoriais. O diagnóstico deve ser verificado utilizando diferentes métodos de diagnóstico.

6 Recolha da amostra, manipulação e armazenamento

Utilize preferencialmente amostras de soro frescas. A colheita de sangue deve cumprir as prescrições legais vigentes no seu país. Não use amostras ictericas, lipemicas, hemolisadas ou que sofreram contaminação bacteriana. O soro com partículas deve ser limpo através de centrifugação a velocidade baixa (<1000 x g). As amostras de sangue devem ser colhidas em tubos limpos, secos e vazios.

Após a separação, as amostras de soro devem utilizar-se durante as primeiras 8 h. Em alternativa, as amostras devem armazenar-se em frascos devidamente fechados a 2-8 °C/35-46 °F até 48h, ou congelados a -20 °C/-4 °F para períodos mais longos. Evite congelar e descongelar várias vezes. Não utilize amostras inativadas pelo calor.

7 Procedimento do teste

7.1 Preparação

Confirme que não se formaram cristais de sal no concentrado. Se isto acontecer, dissolva os cristais aquecendo ligeiramente (à temperatura ambiente deverá ser suficiente) o concentrado.

Dilua o tampão de lavagem de concentrado 1:20 com água destilada (por ex. 950 ml mais 50 ml).

Para preparação do tampão de amostra: adicione 10 ml de tampão de lavagem a uma garrafa de Reagente de Bloqueio e misture bem.

7.2 Passos de teste

Notas importantes:

Siga exatamente este protocolo. Certifique-se de que os dois componentes mencionados no protocolo são adicionados à bandeja nos passos 2, 6, 9.

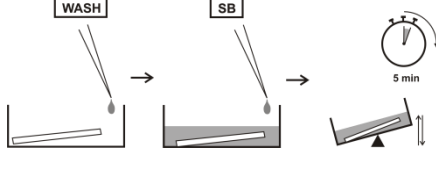
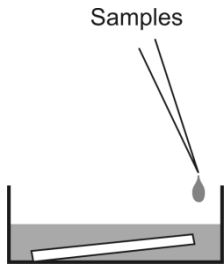
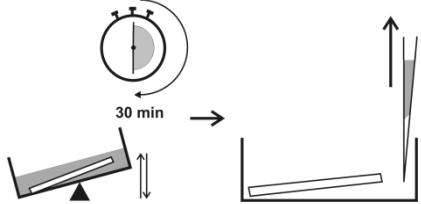
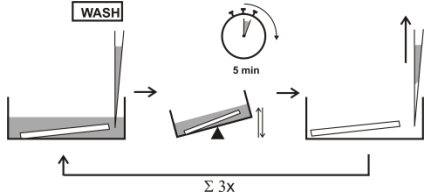
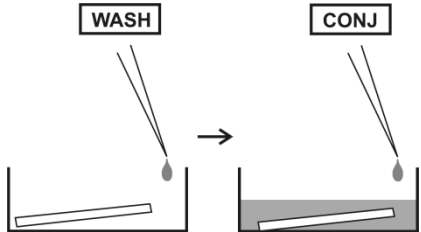
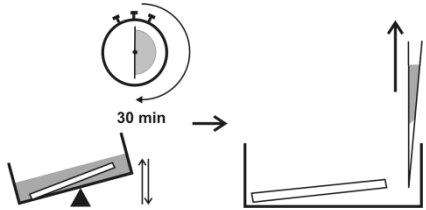
Não deixe a tira secar durante os passos da incubação.

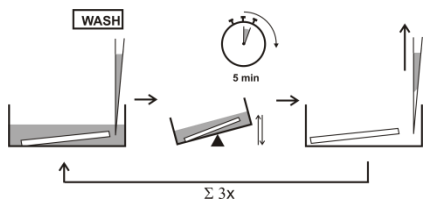
Não toque na tira com os dedos. Utilize pinças.

Retire completamente amostras diluídas depois da incubação da tira para evitar transporte.

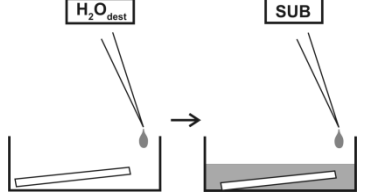
Agite a tira continuamente durante os passos de incubação.

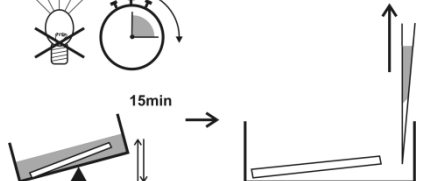
Coloque o tampão de amostra, o conjugado e o substrato juntamente com o tampão de lavagem num dos lados da bandeja de incubação. Não permita que passe por cima da tira.

Passo	Descrição
1.	Verifique se as preparações do passo 7.1 acima foram realizadas antes do início do teste.
2.	 <p>Coloque a tira na orientação correta na bandeja de incubação (linha de referência e codificação de cor para cima). Coloque 700 µl de tampão de lavagem e 300 µl de tampão de amostra na bandeja de incubação. Humedeça a tira com a solução e incube durante 5 minutos com agitação.</p>
CONTROLOS E AMOSTRAS	
3.	 <p>Pipete 10 µl da amostra de soro nas bandejas de incubação designadas com o tampão de amostra.</p>
4.	 <p>Incube durante 30 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F com agitação. Depois disso, retire a amostra completamente.</p>
5.	 <p>Lave 3 vezes durante 5 minutos com 1,5 ml de tampão de lavagem através de agitação. Retire o tampão de lavagem após cada passo de lavagem.</p>
CONJUGADO	
6.	 <p>Pipete 700 µl de tampão de lavagem e 300 µl de conjugado em cada bandeja de incubação com tira.</p>
7.	 <p>Incube durante 30 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F com agitação. Retire o conjugado.</p>

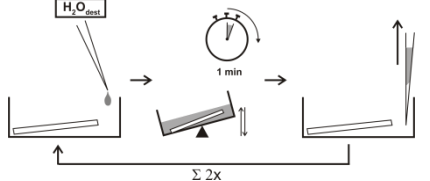
8.  Lave 3 vezes durante 5 minutos com 1,5 ml de tampão de lavagem através de agitação. Retire o tampão de lavagem após cada passo de lavagem.

SUBSTRATO

9.  Pipete 700 µl dH₂O e 300 µl de substrato em cada bandeja de incubação com tira.

10.  Incube durante 15 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F, com agitação, protegida de luz intensa. Retire o substrato.

PARAGEM

11.  Pipete 2 ml dH₂O em cada bandeja de incubação com tira. Incube 1 minuto com agitação. Retire dH₂O. Repita este passo uma vez.

12. Retire a tira da bandeja de incubação. Seque a tira entre o papel do filtro

13. Analise os resultados no espaço de 24 h.

Ref. do produto	4002
Desc. do produto	Vasculitis Pro
N.º Rev. do Manual	006 : 2016-11-07

8 Interpretação qualitativa

8.1 Análise Manual

Os resultados do teste podem considerar-se válidos, se:

- o controlo funcional for visível
- o controlo de corte for visível
- a intensidade de cor do controlo de corte for mais fraca do que a intensidade de cor do controlo funcional

Fixe a tira seca na ficha de resultados alinhada com a linha de referência. Alinhe o modelo de referência com a linha de referência da tira. Interprete os resultados apenas com referência ao controlo de corte de cada tira.

Cada kit de teste contém uma cópia colorida com todas as bandas identificáveis no teste.

A análise é executada ao comparar as intensidades da cor das bandas com a intensidade da cor do controlo de corte. O teste é inconclusivo se as intensidades não divergirem de forma significativa. Se a cor for mais intensa, o resultado do teste é positivo, se a cor for menos intensa, o teste é negativo.

Os resultados podem registar-se na ficha de resultados.

No caso dos valores dos controlos não cumprirem os critérios, o teste é inválido e deverá ser repetido. Recomendamos que volte a testar as amostras que estejam no limite.

Devem também verificar-se as seguintes questões técnicas: prazo de validade dos reagentes (preparados), condições de armazenamento, pipetas, equipamento, condições de incubação e métodos de lavagem.

Se as amostras testadas mostrarem valores aberrantes ou qualquer tipo de desvio ou se os critérios de validação não forem cumpridos por razões que não são da responsabilidade do operador, contacte o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

Os laboratórios médicos podem realizar um controlo de qualidade interno, utilizando controlos próprios e/ou um "pool" de soros interno segundo os regulamentos nacionais.

9 Dados Técnicos

Material de amostra:	soro
Volume de amostra:	10 µl de amostra
Tempo de incubação total:	112 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F.
Armazenamento:	a 2-8 °C/35-46 °F; utilize apenas frascos originais.
Número de determinações:	24 testes

10 Dados do teste / Características do teste

10.1 Sensibilidade e Especificidade Relativas

A fim de determinar a concordância positiva (sensibilidade relativa), 50 soros de pacientes positivos para anticorpos IIF ou ELISA foram testados no **AESKUBLOTS® Vasculitis Pro**. Para determinação da concordância negativa (especificidade relativa), 170 soros de doadores de sangue foram analisados.

	concordância positiva (sensibilidade relativa)	concordância negativa (especificidade relativa)
PR3	96 %	100 %
MPO	92 %	100 %
GBM	100 %	100 %

11 Bibliografia

Csernok E, Muller A, Gross WL (1999). Immunopathology of ANCA-associated vasculitis. Intern Med. 38:759–765.




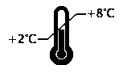

Dolman KM, Stegman CA, van de Wiel BA, Hack CE, von dem Borne AE, Kallenberg CG, Goldschmeding R (1993). Relevance of classic anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (cANCA)-mediated inhibition of proteinase 3-alpha 1-antitrypsin complexation to disease activity in Wegener's granuloma-tosis. Clin Exp Immunol.93:405–410.

Falk, RJ Jennette JC (1988). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. N Engl J Med. 318:1651–1657.

Goldschmeding R, van der Schoot CE, ten Bokkel Huinink D, et al. (1989). Wegener's granulomasis autoantibodies identify a novel di isopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of human neutrophils. J Clin Invest. 84:1577–1587.

Kalluri R, Wilson CB, Weber M (1995). Identification of the a3 chain of type IV collagen as the common autoantigen in anti basement membrane disease and Goodpasture syndrome. J Am Soc Nephrol. 6:1178–1185.

Turner AN, Rees AJ (1998). Anti-glomerular basement membrane disease. In: Rapidly progressive glomerulonephritis. Pusey CD, Rees AJ, eds., Oxford University Press, Oxford.

IVD	" Diagnosi in vitro	" For in vitro diagnostic use
	" Pour diagnostic in vitro	" Para uso diagnóstico in vitro
	" In Vitro Diagnostikum	" In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	" Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	" Numero d'ordine	" Catalogue number
	" Référence Catalogue	" Numéro de catálogo
	" Bestellnummer	" Αριθμός παραγγελίας
	" Número de catálogo	
LOT	" Descrizione lotto	" Lot
	" Lot	" Lote
	" Chargen Bezeichnung	" Χαρακτηρισμός παρτίδας
	" Lote	
CE	" Conformità europea	" EC Declaration of Conformity
	" Déclaration CE de Conformité	" Declaración CE de Conformidad
	" Europäische Konformität	" Ευρωπαϊκή συμφωνία
	" Declaração CE de Conformidade	
	" 24 determinazioni	" 24 tests
	" 24 tests	" 24 pruebas
	" 24 Bestimmungen	" 24 προσδιορισμοί
	" 24 Testes	
	" Rispettare le istruzioni per l'uso	" See instructions for use
	" Voir les instructions d'utilisation	" Ver las instrucciones de uso
	" Gebrauchsanweisung beachten	" Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	" Ver as instruções de uso	
	" Da utilizzarsi entro	" Use by
	" Utilise avant le	" Utilizar antes de
	" Verwendbar bis	" Χρήση μέχρι
	" Utilizar antes de	
	" Conservare a 2-8°C	" Store at 2-8°C (35-46°F)
	" Conserver à 2-8°C	" Conservar a 2-8°C
	" Lagerung bei 2-8°C	" Φυλάσσεται στους 2-8°C
	" Conservar entre 2-8°C	
	" Prodotto da	" Manufactured by
	" Fabriqué par	" Fabricado por
	" Hergestellt von	" Κατασκευάζεται από
	" Fabricado por	
STRIP	" Strip di nitrocellulosa rivestita	" Coated nitrocellulose strip
	" Strip de nitrocellulose couché	" Tira de nitrocelulosa recubierta
	" Nitrozellulosemembran-Streifen mit aufgebracht Antigenen	" Επίστρωση λωρίδα νιτροκυτταρίνης
	" Tira de nitrocelulose revestido	
WASH 20x	" Tamponi di lavaggio	" Wash buffer
	" Tampon de Lavage	" Solución de lavado
	" Waschpuffer	" Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	" Solução de lavagem	
Block-Reag	" Reagente bloccante	" Blocking Reagent
	" réactif de blocage	" Reactivo bloqueante
	" Blockier-Reagenz	" Αντιδραστήριο αποκλεισμού
	" Bloqueio de reagente	
RCNS 10ml	" Ricostituire con 10 mL	" Reconstitute with 10 mL
	" reconstituer avec 10 mL	" reconstituir con 10 mL
	" rekonstituieren mit 10 mL	" Ανασύσταση με 10 mL
	" reconstituir com 10 mL	
SB	" Tamponi campione	" Sample buffer
	" Tampon Echantillons	" Tampón Muestras
	" Probenpuffer	" Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	" Diluente de amostra	
CONJ	" Coniugato	" Conjugate
	" Conjugé	" Conjugado
	" Konjugat	" Σύζευγμα
	" Conjugado	
SUB	" Tamponi substrato	" Substrate buffer
	" Substrat	" Tampón sustrato
	" Substratpuffer	" Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	" Substrato	

