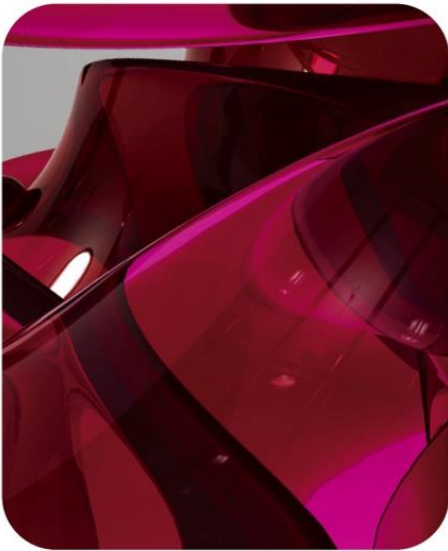




AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUBLOTS®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKUBLOTS® Vasculitis Pro
Ref 4002



Product Ref.	4002
Product Desc.	Vasculitis Pro
Manual Rev. No.	006 : 2016-11-07

Manual de instrucciones

Tabla de contenidos

1	Utilización	1
2	Aplicaciones clínicas y principio del análisis.....	1
3	Contenido del kit	2
4	Almacenamiento y caducidad	2
5	Precauciones de uso e instrucciones generales	3
6	Obtención, manipulación y almacenamiento de las muestras	4
7	Procedimiento del ensayo.....	4
8	Interpretación cualitativa	7
9	Datos técnicos	7
10	Datos de funcionamiento	8
11	Bibliografía.....	8



1 Utilización

AESKUBLOTS® Vasculitis Pro es un enzimoimmunoensayo de membrana para la detección cualitativa de anticuerpos IgG frente a PR3, MPO y GBM en suero humanos. Los antígenos se sitúan en forma de líneas paralelas en posiciones exactamente definidas sobre la membrana de nitrocelulosa.

El ensayo se utiliza para el diagnóstico diferencial de la vasculitis autoinmunitaria.

2 Aplicaciones clínicas y principio del análisis

Los anticuerpos frente a la mieloperoxidasa (MPO) y proteinasa 3 (PR3) pertenecen al grupo de los anticuerpos citoplásmicos antineutrófilos (ANCA), que se dirigen contra los componentes citoplasmáticos de los monocitos y granulocitos neutrófilos. Los ANCA son marcadores importantes para el diagnóstico diferencial de la vasculitis autoinmunitaria. Los anticuerpos anti-PR3 son marcadores serológicos específicos de la granulomatosis (de Wegener) con poliangitis y pueden desempeñar una función activa en la patogénesis de la GW. Los títulos del anticuerpo anti-PR3 están estrechamente asociados con la actividad de la enfermedad e inhiben la actividad proteolítica de la PR3. Los anticuerpos anti-MPO están correlacionados con la vasculitis idiopática o la vasculitis asociada a la glomerulonefritis semilunar necrotizante y se encuentran con frecuencia en el 70 % de los pacientes con poliangitis microscópica y en el 5-50 % de los pacientes con síndrome de Churg-Strauss.

En la actualidad, la determinación de los autoanticuerpos circulantes frente a la membrana basal glomerular (GBM) es una innovadora prueba de serología para el diagnóstico del síndrome de Goodpasture. Este trastorno autoinmunitario renal recibe su nombre de Ernest Goodpasture, la primera persona que describió la coexistencia de una hemorragia pulmonar mortal con una glomerulonefritis progresiva.

Principio del análisis

Los antígenos se aplican en forma de líneas sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea para impedir reacciones no específicas. Las tiras de membrana con antígenos específicos se incuban en posiciones exactamente definidas en muestras de suero diluidas en una proporción de 1:101. Los anticuerpos del paciente, si están presentes en la muestra, se unen al antígeno. La fracción no unida es eliminada por lavado en el paso siguiente. Después se incuban inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa de rábano picante (conjugado), que reaccionan con el complejo antígeno-anticuerpo de las muestras. El conjugado no unido se elimina por lavado en el paso siguiente. Tras la adición del sustrato TMB, una reacción enzimática convierte el conjugado en un precipitado azul. La reacción se detiene con agua destilada.

3 Contenido del kit

SE DEBE RECONSTITUIR				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Reactivo bloqueante	3 x para 10 ml de concentrado cada uno	blanco	N/A	Leche descremada en polvo para preparación de 3 x tampón para muestra de 10 ml
Tampón de lavado (20x)	1 x 50 ml	blanco	incoloro	Concentrado 20 veces para preparación de 1 l tampón Tris, pH 6,9 ± 0,2
LISTO PARA EL USO				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Conjugado, IgG	1 x 10 ml	azul	incoloro	Contiene: Inmunoglobulina anti-humana G (IgG) conjugada con peroxidasa de rábano picante
Sustrato TMB	1 x 10 ml	negro	incoloro	TMB/H ₂ O ₂ estabilizada
Tiras de membrana	24 tiras	Codificación por colores: Púrpura	N/A	Antígenos recubiertos, véase Utilización
Pinzas, plantilla de referencia, hoja de resultados, cinta adhesiva (doble cara, negra)	1 por cada kit	N/A	N/A	N/A
bandeja de incubadora	3 por cada kit	N/A	N/A	N/A
Etiquetas de tampón para muestra	3 por cada kit	N/A	N/A	N/A
MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO				
Plataforma de agitación, cilindro para 1000 ml, cilindro o pipeta para 10 ml, pipetas de precisión (10, 1000 µl), papel de filtro o absorbente. Nuestras pruebas se han diseñado para usarse con agua destilada, de acuerdo con la definición de las farmacopeas de Estados Unidos (USP 26 - NF 21) y Europa (Eur.Ph. 4. ^a ed.).				

4 Almacenamiento y caducidad

Mantenga todos los reactivos y tiras de membrana a 2-8 °C/35-46 °F en sus recipientes originales. Una vez preparadas, las soluciones de reconstitución serán estables a 2-8 °C/35-46 °F durante al menos seis semanas. Los reactivos y las tiras deberán utilizarse antes de la fecha de caducidad indicada en cada componente. No utilice los componentes una vez superada la fecha de caducidad. Evite la exposición intensa a la luz de la solución TMB.

5 Precauciones de uso e instrucciones generales

5.1 Datos de riesgo para la salud

Este producto se ha diseñado exclusivamente para DIAGNÓSTICO IN VITRO. Como consecuencia, el kit sólo puede ser utilizado por personal con la cualificación apropiada y formación especial sobre los métodos de diagnóstico in vitro. Aunque este producto no se considera especialmente tóxico ni peligroso en las condiciones de uso previsto, siga estas recomendaciones para garantizar un nivel de seguridad óptimo:

Recomendaciones y precauciones

Este kit incluye componentes potencialmente peligrosos. Aunque los reactivos del kit no están clasificados como irritantes para los ojos o la piel, se recomienda evitar el contacto con los ojos y la piel, y llevar guantes desechables.

El sustrato contiene kathon (1% v/v) como conservante. No se debe ingerir ni permitir que entre en contacto con la piel ni la membrana mucosa.

Está prohibido fumar, comer y beber mientras se manipula el kit. La pipeta no se debe llevar a la boca.

Manipule las muestras del paciente como si existiera riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas y siguiendo los requisitos de su país.

5.2 Instrucciones generales de uso

A fin de diferenciar los distintos análisis **AESKUBLOTS®** disponibles, se aplica una codificación por colores encima de la línea de referencia de las tiras:

Codificación por colores	AESKUBLOTS®
Amarillo	ANA-12 Pro
Naranja	ANA-17 Pro
Azul	Myositis Pro
Marrón	Liver Pro
Púrpura	Vasculitis Pro
Negro	Gastro Pro
Verde	Borrelia-G y Borrelia-M

En caso de que observe datos incorrectos en la información del producto, incluidas las etiquetas, póngase en contacto con el fabricante o proveedor del producto.

El reactivo bloqueante y el tampón de lavado se pueden intercambiar entre lotes y kits de análisis. Los componentes restantes son específicos de cada kit de prueba y no se deben intercambiar. No intercambiar los componentes de los reactivos entre los kits de autoinmunidad y borrelia.

No utilice recipientes de poliestireno para manipular el conjugado.

Permita que todos los componentes alcancen la temperatura ambiente (20-32 °C/68-89,6 °F) antes de utilizarlos, mézclelos bien y siga el esquema de incubación recomendado para conseguir un rendimiento óptimo.

No exponga nunca los componentes a temperaturas superiores a los 37 °C/98,6 °F.

Pipetee siempre la solución de sustrato con puntas completamente nuevas. Proteja el reactivo de la luz. No pipetee nunca el conjugado con puntas utilizadas anteriormente con otros reactivos.

La intensidad del color de banda no está necesariamente correlacionada con los títulos de anticuerpos obtenidos mediante otras metodologías de referencia.

Las muestras obtenidas de donantes de sangre aparentemente sanos pueden contener autoanticuerpos.

Si la muestra del paciente contiene niveles elevados de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobulina, no se podrán descartar falsos positivos provocados por uniones no específicas.

El diagnóstico clínico definitivo no debería fundamentarse únicamente en los resultados de la prueba realizada, sino que debería llevarlo a cabo el médico una vez evaluados todos los datos clínicos y analíticos. El diagnóstico debe verificarse utilizando diferentes métodos de diagnóstico.

6 Obtención, manipulación y almacenamiento de las muestras

Deben utilizarse preferentemente muestras de suero recién extraídas. La extracción de sangre debe cumplir los requisitos de protocolo de su país. No deben utilizarse muestras ictericas, lipémicas, hemolizadas ni contaminadas con bacterias. Las muestras de suero con partículas se deben limpiar mediante centrifugación a baja velocidad (<1000 x g). Las muestras de sangre deben recogerse en tubos limpios, secos y vacíos.

Tras la separación, las muestras de suero han de utilizarse durante las primeras 8 horas. Como alternativa, las muestras deberían conservarse en viales herméticamente cerrados a 2-8 °C/35-46 °F durante un máximo de 48 horas o congelados a -20 °C/-4 °F durante periodos más prolongados. Evite congelar y descongelar las muestras repetidas veces. No utilice muestras inactivadas térmicamente.

7 Procedimiento del ensayo

7.1 Preparativos antes de comenzar

Confirme que no se hayan formado cristales salinos en el concentrado. En caso de que esto ocurra, caliente ligeramente el concentrado (basta con utilizar temperatura ambiente) para disolver los cristales.

Diluya la solución concentrada de tampón de lavado a 1:20 con agua destilada (por ejemplo, 950 ml con 50 ml).

Para preparar un tampón para muestra: agregue 10 ml de tampón de lavado a un frasco de Reactivo bloqueante y mezcle bien.

7.2 Pasos del análisis

Notas importantes:

Siga exactamente este protocolo. Asegúrese de que los dos componentes mencionados en el protocolo se añaden a la bandeja en los pasos 2, 6, 9.

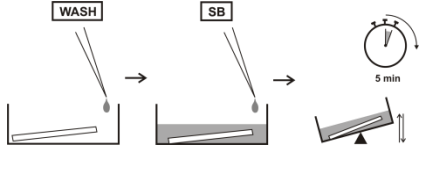
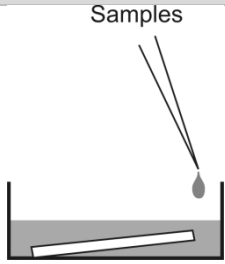
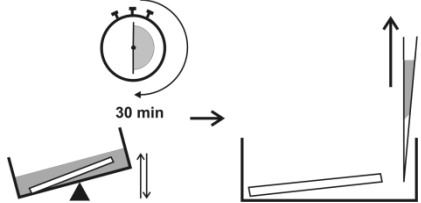
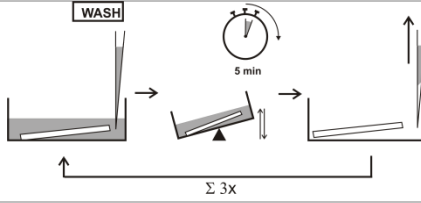
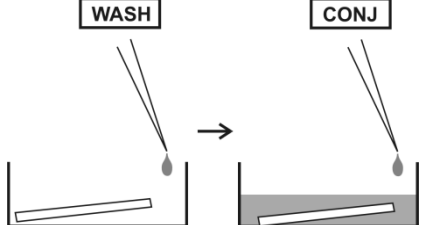
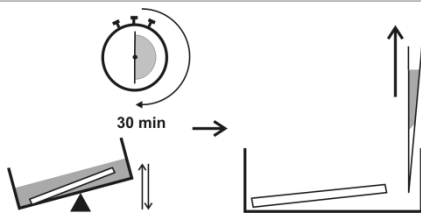
No permita que la tira se seque durante los pasos de incubación.

No toque la tira con los dedos; use las pinzas.

Retire por completo las muestras diluidas tras la incubación de la tira a fin de evitar su arrastre.

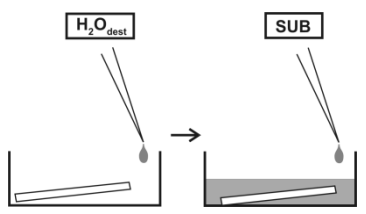
Agite continuamente la tira durante los pasos de incubación.

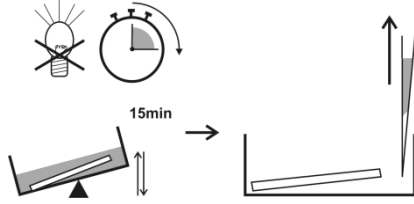
Vierta el tampón para muestra, el conjugado y el sustrato junto con el tampón de lavado en un lado de la bandeja de incubación. No permita que fluya sobre la tira.

Paso	Descripción
1.	Asegúrese de que los preparativos del paso 7.1 (arriba) se han llevado a cabo antes del comienzo del análisis.
2.	 <p>Sitúe la tira en la orientación correcta dentro de la bandeja de incubación (línea de referencia y codificación por color hacia arriba). Coloque 700 µl de tampón de lavado y 300 µl de tampón para muestra en la bandeja de incubación. Humedezca la tira con la solución e incube durante 5 minutos con agitación.</p>
CONTROLES y MUESTRAS	
3.	 <p>Pipetee 10 µl de muestra de suero en el interior de las bandejas de incubación designadas con tampón para muestra.</p>
4.	 <p>Incube durante 30 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F con agitación. A continuación, retire la muestra por completo.</p>
5.	 <p>Lave tres veces durante 5 minutos con 1,5 ml de tampón de lavado y agitación. Retire el tampón de lavado después de cada paso de lavado.</p>
CONJUGADO	
6.	 <p>Pipetee 700 µl de tampón de lavado y 300 µl de conjugado en cada bandeja de incubación con tira.</p>
7.	 <p>Incube durante 30 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F con agitación. Retire el conjugado.</p>

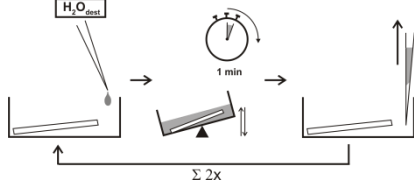
8.  Lave tres veces durante 5 minutos con 1,5 ml de tampón de lavado y agitación. Retire el tampón de lavado después de cada paso de lavado.

SUSTRATO

9.  Pipetee 700 µl de dH₂Oy 300 µl de sustrato en cada bandeja de incubación con tira.

10.  Incube durante 15 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F con agitación y evite que reciba luz intensa. Retire el sustrato.

PARO

11.  Pipetee 2 ml de dH₂O en cada bandeja de incubación con tira. Incube durante 1 minuto con agitación. Retire el dH₂O. Repita este paso.

12. Retire la tira de la bandeja de incubación. Seque la tira con papel de filtro.

13. Analice los resultados antes de que transcurran 24 h.

8 Interpretación cualitativa

8.1 Análisis manual

Los resultados del análisis se pueden considerar válidos si:

- El control funcional es visible.
- El control de cut-off es visible.
- La intensidad del color del control de cut-off es más débil que la del control funcional.

Fije la tira seca a la hoja de resultados alineada con la línea de referencia. Alinee la plantilla de referencia con la línea de referencia de la tira. Interprete los resultados tomando como referencia exclusivamente el control de cut-off de cada tira.

Cada kit de análisis contiene una copia a color con todas las bandas que se pueden probar en el análisis.

El análisis se lleva a cabo comparando las intensidades color de las bandas con la intensidad de color del control de cut-off. El análisis se debe considerar dudoso si las intensidades no difieren sustancialmente. Si el color es más intenso, el resultado es positivo; si la intensidad de color es más débil, el análisis es negativo.

Los resultados se pueden registrar en la hoja de resultados.

En caso de que los valores de los controles no se ajusten a los criterios, el análisis se considerará no válido y deberá repetirse. Es aconsejable repetir el análisis de aquellas muestras que se encuentren en el límite.

Será necesario comprobar los siguientes problemas técnicos: fechas de caducidad de los reactivos (preparados), condiciones de almacenamiento, pipetas, equipo, condiciones de incubación y métodos de lavado.

Si al analizar las muestras se obtuvieron valores anómalos, se produjo algún tipo de desviación o los criterios de validación no se cumplieron por motivos fuera de la responsabilidad del técnico, póngase en contacto con el fabricante o el proveedor del producto.

Los laboratorios médicos deberían realizar un control de la calidad interno mediante controles propios y/o una mezcla de sueros interna, tal y como contemplan las normativas de su país.

9 Datos técnicos

Material de muestra:	suero
Volumen de muestra:	10 µl de muestra
Tiempo total de incubación:	112 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F
Almacenamiento:	a 2-8 °C/35-46 °F; use exclusivamente los viales originales.
Número de determinaciones:	24 análisis

10 Datos de funcionamiento

10.1 Sensitividad relative y Especificidad relativa

50 muestras de suero de pacientes con resultado positivo en anticuerpos IFI o ELISA fueron analizadas con **AESKUBLOTS® Vasculitis Pro** con el fin de determinar la concordancia entre resultados positivos (sensitividad relativa). La concordancia entre resultados negativos (especificidad relativa) fue determinada con el analisis de 170 muestras de suero de pacientes sanos.

	concordancia entre resultados positivos (sensitividad relative)	concordancia entre resultados negativos (especificidad relativa)
PR3	96 %	100 %
MPO	92 %	100 %
GBM	100 %	100 %

11 Bibliografía

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




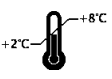

Dolman KM, Stegman CA, van de Wiel BA, Hack CE, von dem Borne AE, Kallenberg CG, Goldschmeding R (1993). Relevance of classic anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (cANCA)-mediated inhibition of proteinase 3-alpha 1-antitrypsin complexation to disease activity in Wegener's granuloma-tosis. Clin Exp 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
	Déclaracão 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)
	Conservar 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 νιτροκυταρίνης
	Tira de nitrocelulose revestido	
WASH 20x	Tampone 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
	Bloqueo 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	Tampone campione	Sample buffer
	Tampon Echantillons	Tampón Muestras
	Probenpuffer	Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	Diluyente de amostra	
CONJ	Coniugato	Conjugate
	Conjugé	Conjugado
	Konjugat	Σύζευγμα
	Conjugado	
SUB	Tampone substrato	Substrate buffer
	Substrat	Tampón sustrato
	Substratpuffer	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	Substrato	

