AESKU.DIAGNOSTICS

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

***AESKUSLIDES®* ANA HEp-2**

Ref 51.1xx

CE

AESKUSLIDES®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



eIFU
WWW.AESKU.COM

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ANA HEp-2

Ref. Padrão	Descrição	Testes
51.100	**ANA HEp-2** (12 poços)	120
51.101	**ANA HEp-2** (12 poços)	120
51.100.Bulk5	**ANA HEp-2** (12 poços) Bulk Kit	600
51.101.Bulk5	**ANA HEp-2** (12 poços) Bulk Kit	600
51.180	**ANA HEp-2** (18 poços)	180
51.181	**ANA HEp-2** (18 poços)	180
51.180.Bulk5	**ANA HEp-2** (18 poços) Bulk Kit	900
51.181.Bulk5	**ANA HEp-2** (18 poços) Bulk Kit	900

Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim
Germany
Phone: +49 6734 9622-0
Fax: +49 6734 9622-2222
Website: www.aesku.com
Mail: info@aesku.com

Índice de conteúdo

1. FIM DE UTILIZAÇÃO 1
2. APLICAÇÃO CLÍNICA 1
3. PRINCÍPIO DO TESTE 2
4. AVALIAÇÃO 2
4.1 Padrão da membrana do núcleo da célula 2
4.2 Padrões do plasma do núcleo celular (padrões nucleoplasmáticos) 3
4.3 Padrões nucleolares 5
4.4 Padrões do fuso mitótico 5
4.5 Padrões citoplasmáticos 7
4.6 Negativo 8
4.7 Indeterminável 8
4.8 Anexo 9
5. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS 10
a. Tabela 1: Conjunto de Dados Combinados de Intervalos de Dados 10
b. Tabela 2: Variável Determinante de Comparação de Padrão de Conjunto de Dados Combinados vs Aesku 10
5.1 Reprodutibilidade e Precisão 10
6. FICHA DE INTERPRETAÇÃO DE DADOS 11
7. CONTEÚDO DE KITS PADRÃO 12
8. CONTEÚDO DE REAGENTES COMUNS 14
8.1 Reagentes Comuns 14
8.2 Materiais requeridos mas não fornecidos 15
9. ARMAZENAMENTO E VALIDADE 15
10. AVISOS E MEDIDAS DE PRECAUÇÃO 16
c. Risco para a saúde 16
d. Avisos gerais 16
11. TOMADA DE AMOSTRAS, PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO 17
12. PROCEDIMENTO DO TESTE 17
e. Preparação 17
f. Realização do teste 18
g. Fluxo de trabalho 19
13. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS 20
14. SÍMBOLOS REGULAMENTARES 21

ANA HEp-2

1. FIM DE UTILIZAÇÃO

***AESKUSLIDES*® ANA HEp-2** é um teste de imunofluorescência indirecto para a determinação de auto-anticorpos nucleares e/ou citoplasmáticos em soro humano.

O teste serve para o diagnóstico diferencial de doenças reumáticas sistémicas como o lupus eritematoso sistémico (LES), colagenoses mistas (doenças mistas do tecido conjuntivo, DMTC), esclerodermia, síndrome de Sjögren, polimiosite e dermatomiosite.

2. APLICAÇÃO CLÍNICA

Anticorpos antinucleares (ANA) são dirigidos contra um grande número de antígenos nucleares e citoplasmáticos e ocorrem com frequência em doenças reumáticas sistémicas. A sua detrminação é por isso um meio auxiliar importante para o diagnóstico diferencial. Por exemplo anticorpos SS-A (Ro)- e SS-B (La) estão associados com LES e o síndrome de Sjögren (SS), anticorpos anti-dsDNA e anti-Sm, anticorpos contra histonas e contra nucleossomas com o LES (lupus eritematoso sistémico). Anticorpos anti-RNP estão associados com colagenoses mistas e LES, anticorpos anti-Scl-70 com esclerodermia, anticorpos com esclerodermia (esclerose sistémica progressiva, PSS), anticorpos anti-Jo-1 com polimiosite e dermatomiosite e anticorpos contra proteínas de centrómero com o síndrome de CREST. Para obter instruções pormenorizadas, consulte a Secção 4 abaixo.

O método preferido para detecção de ANA era até então o teste indirecto de imunofluorescência (IFT) em células eucarióticas como HeLa e Hep2. O IFT é realmente um método sensitivo, contudo testar uma grande quantidade de soros torna-se trabalhoso. Além disso o sistema de teste pode estar sujeito a certos erros, devido à interpretação dos resultados do teste pelo pessoal de laboratório e as diferenças dos microscópios de fluorescência. A especificidade dos ANA particulares pode ser determinada mediante testes com ELISAs específicos que utilizam os antígenos específicos correspondentes. Isto permite uma diferenciação simples e mais fiável dos ANA segundo a sua especificidade.

Antígeno: Células HEp-2

Reacções cruzadas: não são conhecidas

O teste baseia-se no princípio da imunofluorescência indirecta:

Lâminas estão revestidas com secções de tecido ou células (HEp2 para determinação de ANA, granulócitos para determinação de ANCA ou Crithidia luciliae para determinação de anticorpos de anti-nDNA). Se um soro de doente conter anticorpos contra componentes dos tecidos ou das células, estes ligam-se numa primeira etapa de incubação ao substrato correspondente na lâmina. Partes do soro não ligadas são eliminadas numa etapa de lavagem. Os anticorpos ligados do doente são comprovados numa segunda etapa por imunoglobulinas antihumanas marcadas por fluoresceína, que se ligam aos anticorpos do doente, tornando-os visíveis pelo seu corante fluorescente. Disto resulta uma fluorescência específica verde dos complexos antígeno-anticorpos, que se tornam visíveis sob um microscópio de imunofluorescência.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

Consulte o Procedimento do Teste indicado no Manual Comum, Secção 12, para obter instruções pormenorizadas. Utilizar-se-ão os pormenores seguintes nos kits de ANA HEp-2:

- Contador de tempo de coloração: 30 a 90 segundos
- Título de despistagem recomendado:
  - 1:80 para amostras de adultos
  - 1:40 para amostras pediátricas.

4. AVALIAÇÃO

Células HEp-2 são células epitélicas humanas que são cultivadas a partir do tecido do carcinoma de laringe de um doente. O substrato oferece um crescimento de células homogéneo sem ligações celulares. Para avaliação de amostras são muito importantes células em estado de mitose, porque dessa forma podem ser determinados padrões nucleares com uma maior precisão.

O respectivo título final é aquela diluição de um soro de doente em que este apresenta ainda uma fluorescência positiva.

A avaliação deverá ser sempre efectuada com um controlo positivo e um controlo negativo. Fluorescências fracas dos núcleos celulares a títulos de 1:40 (crianças) e 1:80 (adultos) ou falta de clareza em relação aos resultados clínicos devem ser controladas com base nos controlos.

Num tal caso as amostras dos doentes deverão ser recolhidas aprox. cada 6 semanas e ser medidas por meio de um procedimento igual.[1]

4.1 Padrão da membrana do núcleo da célula

4.1.1 Ligeira coloração da membrana nuclear

Ligeira fluorescência homogência ligeira semelhante a um anel da membrana do núcleo celular em células de interfase. Algumas amostras com anticorpos fortes dão a impressão de uma coloração de todo o núcleo celular. Um padrão semelhante pode ser observado em células na telofase. Contudo esta fluorescência apresenta-se difusa no citoplasma em células de metafase e o material cromosomal permanece sem coloração.

[1] Wiik A. Scand J Rheumatol 2005; 34:260-8.

4.1.2 Padrão interrompido da membrana do núcleo celular

Uma fluorescência discontínua interrompida ao longo da membrana do núcleo celular. Ao focar através do núcleo celular pode ser observada a coloração interrompida na superfície do núcleo celular completo.

Um padrão semelhante apresenta-se na telófase. Em células em metáfase a fluorescência está distribuída difusamente sobre o citoplasma. Algumas amostras com anticorpos fortes dão a impressão de uma coloração de todo o núcleo celular.

4.2 Padrões do plasma do núcleo celular (padrões nucleoplasmáticos)

4.2.1 Padrão homogéneo do núcleo celular

Uma fluorescência uniforme difusa sobre todo o nucleoplasma, que por vezes pode estar destacada na periferia do núcleo da célula, pode ser relacionada com diferentes anticorpos, que se dirigem na sua maioria contra componentes dos cromossomas (DNA, histonas, etc.). Nalguns casos apresenta-se uma coloração mais intensa da área interior do núcleo celular (borda nuclear).

Algumas amostras podem apresentar adicionalmente uma coloração periférica dos nucleólos. A coloração dos nucleólos é variável. Na metáfase pode ser observada uma coloração homogénea ou uma coloração da cromatina.

Podem ser facilmente distinguidos os seguintes padrões diferentes:

- Homogéneo nuclear com coloração homogénea dos nucleólos
- Homogéneo nuclear com nucléolos negativos

4.2.2 Coloração salpicada do núcleo celular

Encontram-se uma série de padrões salpicados do núcleo celular que são difíceis de distinguir. Com o devido cuidado podem ser diferenciados sete padrões. Cromossomas da metafase permanecem negativos em seis destes padrões e apresentam uma coloração positiva no chamado padrão de centrômero.

4.2.3 Padrão nuclear de grandes salpicos (matriz nuclear) (SC35)

Salpicaduras de tamanhos diferentes espalhados pelo nucleoplasma, anteriormente designado por coloração da matriz nuclear. Ocorre provavelmente devido a coloração dos grânulos intercromatina. Os nucleólos permanecem negativos. O citoplasma da metáfase e da telófase apresenta salpicos dispostos de forma difusa com cromatina negativa.

4.2.4 Padrão nuclear de salpicos grossos

Padrões salpicados de tamanhos diferentes distribuídos de forma compacta, normalmente acompanhados de grandes salpicaduras espalhadas sobre o nucleoplasma de células em intérfase. Os nucleólos permanecem negativos. O citoplasma das células da metáfase e telófase apresenta um padrão salpicado mais denso em torno da cromatina, a própria cromatina mantém-se negativa.

Este padrão está em geral associado a uma coloração dos spliceossomas.

4.2.5 Padrão salpicado fino do núcleo celular

Uma coloração finamente salpicada em distribuição uniforme, por vezes muito espessa, de forma a que o padrão pareça aproximadamente homogéneo. Os nucleólos podem ser positivos (nomeadamente com anticorpos anti-SS-B/La), ou então também manter-se negativos. O citoplasma de células em metáfase apresenta um padrão salpicado fino, com um aglomerado em torno da cromatina que se mantém negativa. Os nucleólos das células na telófase podem ser positivos, por vezes têm aqui uma coloração mais intensa que nas células em intérfase.

4.2.6 Padrão granulado semelhante a Scl 70

Um padrão salpicado granulado fino e uniforme do nucleoplasma e das áreas cromossomais em células na metáfase e telófase, frequentemente com nucleólos positivos destacados. A coloração pode aparecer homogénea em ampliações pequenas. Este padrão não é unicamente observado em soros positivos anti-Scl 70.

4.2.7 Núcleos celulares com padrão salpicado pleomorfo

Os núcleos de células, que se encontram em proliferação (fase S), apresentam um grande número de diferentes padrões salpicados do nucleoplasma, de fino até muito grosso, salpicos irregulares (consoante a preparação da célula isso pode afectar 10-50 % das células). Em algumas células os nucleólos também estão corados. Células em fase de repouso (fase G) e em metáfase permanecem negativas. Este padrão também é designado de padrão anti-PCNA (anti-proliferating cell nuclear antigen) e surge normalmente em associação com outros padrões.

4.2.8 Padrão centrômero

Salpicos separados bastante uniformes que se encontram espalhados por todo o núcleo celular (40-60 salpicos por núcleo celular). Células em telófase e metáfase apresentam sempre estes salpicos no material de cromossomas condensado. Este padrão é causado por anticorpos contra os cinetócoros dos cromossomas. Os anticorpos podem estar dirigidos contra várias proteías de centrômero (CENP-A, B, C, D, E).

4.2.9 Múltiplos pontos nucleares (NSp-1)

5-10 pontos (dots) por núcleo celular. Aqui as subestruturas nucleares encontram-se coradas, que são frequentemente designadas como corpúsculos PNL (devido ao seu surgimento pronunciado em caso de leucemia promielocítica). Cromossomas da metáfase e telófase permanecem negativos.

4.2.10 Pontos nucleares enovelados (alguns pontos nucleares)

2-6 Pontos por núcleo celular que são localizados no nucleoplasma. Encontram-se frequentemente em proximidade estreita dos nucleólos. Sem coloração da cromatina da metáfase ou da telófase.

4.3 Padrões nucleolares

4.3.1 Padrão nucleolar homogéneo

Fluorescência de todo o nucleólo sem coloração dos cromossomas ou da região organizadora do nucléolo (NOR) em células em divisão.

4.3.2 Padrão nucleolar tipo amontoado

Grânulos maiores claros apinhados, que fazem parte dos centros fibrilares dos nucleólos. Em células mitóticas a placa metafásica e a placa telofásica parecem ter uma fluorescência irregular tipo leque.

4.3.3 Padrão nucleolar interrompido

Grãos pequenos separados que se encontram principalmente nos centros dos nucleólos. Em células de metáfase podem ser encontrados 2 a 5 salpicos discretos dentro do corpo de cromatina.

4.4 Padrões do fuso mitótico

4.4.1 Padrão centríolos (centrossoma)

Nos fusos de metáfase podem ser observados pontos de fluorescência discretos em cada um dos pólos de fuso que se encontram verticalmente entre si.

Em células de interfase podem ser observados um ou dois pontos claros no citoplasma, que se situam perto do núcleo celular.

4.4.2 Padrão dos pólos de fuso (NuMA)

Fluorescência em áreas de pólo de fuso em células de metáfase (padrão em forma de triângulo ou de banana). As fibras de fuso são negativas com um padrão mais linear em célula de telófase. Um padrão salpicado fino com nucleólos negativos é observado com maior frequência em células em repouso ou em telófase, contudo estas também podem ser negativas.

4.4.3 Padrão das fibras do fuso

Uma coloração de todo o aparelho de fibras do fuso, do pólo às placas de cromatina em células de metáfase. Sem coloração de cromossomas nas células em repouso ou em mitose.

4.4.4 Padrão Midbody (MSA-2)

Em células de prófase e metáfase, a fluorescência apresenta-se como tiras finas na região cromossomal, posicionadas verticalmente em relação à placa de metáfase. Na telófase a fluorescência está limitada ao sulco de divisão e a um corpo central estreito de união (Midbody) entre as células, que terminam a mitose. Células na fase S e G2 apresentam salpicos discretos ou díspares. O padrão é causado por anticorpos contra o antígeno MSA-2 (Mitotic Spindle Antigen 2).

4.4.5 Padrão C-F

A característica mais destacada encontra-se em células de metáfase, nas quais o padrão é composto por dois grupos de grandes grãozinhos densos, que envolvem a placa de metáfase cromossomal como uma pega, sendo muitas vezes parecido com um fecho de correr. Estes grãos fazem parte dos centrômeros. O citoplasma circundante tem coloração difusa. Nas células em prófase apresenta-se uma acumulação densa interrompida junto aos cromossomas. Um padrão salpicado nuclear denso e muito fino pode ser observado em algumas células de interfase. O padrão é causado por anticorpos contra o antígeno MSA-3 (Mitotic Spindle Antigen 3), que pode ser idêntico à proteína F do centrômero (CENP-F).

4.5 Padrões citoplasmáticos

4.5.1 Padrão salpicado fino do citoplasma

Grãozinhos finos que estão distribuídos sobre todo o citoplasma. Surgem frequentemente mais claros na periferia da célula, assemelhando-se a uma imagem de poeira estelar. Sem coloração dos núcleos celulares ou nucleólos. Este padrão é característico de anticorpos dirigidos contra sintetases tRNA. Os cromossomas na metáfase são negativos.

4.5.2 Padrão citoplasmático difuso

Uma fluorescência muito fina, densa, granular ou homogénea ou um padrão semelhante a uma nuvem, que ocupa partes do citoplasma. Sem coloração dos núcleos celulares, contudo os nucleólos podem apresentar coloração homogénea, se anticorpos estiverem dirigidos contra proteínas RNA ribossomais, cujos precursores estejam localizados nos nucleólos. O material cromossomal em células de metáfase é negativo.

4.5.3 Padrões mitocondriais

Grãozinhos maiores irregulares, que se estendem numa rede reticular do núcleo celular até ao citoplasma. A aglomeração de antígenos M2, que é principalmente detectada, é composta por 4 proteínas mitocondriais da membrana mitocondrial interna. Núcleos celulares e nucleólos são negativos, soros com elevados títulos de anticorpos podem contudo dar a impressão de um padrão salpicado do núcleo celular.

4.5.4 Padrão lisossomais

Fluorescência irregular entre as grandes organelas, distribuída sobre o citoplasma. Isto pode ser causado por anticorpos contra pequenas organelas como lisossomas ou peroxissomas. O núcleo celular não é corado, mas há coloração difusa do citoplasma de células em divisão.

4.5.5 Padrão Golgi

Coloração das organelas polares perto do núcleo celular, grânulos de tamanho irregular. O núcleo celular e os nucleólos são negativos. Coloração difusa do citoplasma de células em divisão, que se destaca na área do material cromossomal.

4.5.6 Padrão actina

Coloração de fibras da tensão da célula que se situam num plano focal simples directamente abaixo da membrana plasmática. Núcelos celulares, nucleólos e cromossomas são negativos. Feixes de filamentos de actina perto da membrana plasmática estendem-se sobre todo o comprimento da célula. Da mesma forma pode ser observada a expansão dendrítica sobre a membrana celular.

4.5.7 Padrão vimentina

Fibras finas em quantidade abundante estendem-se sobre todo o citoplasma e produzem na coloração uma rede radiada. Da mesma forma feixes de fibras agregados podem estar corados em torno do núcleo celular, aparecendo em espiral. Núcleos celulares e nucleólos são negativos.

4.6 Negativo

4.6.1 Exemplo 1

O citoplasma ou os núcleos celulares apresentam-se quase sem fluorescência verde. Alguns pontos separados, frequentemente irregulares, observáveis no campo de visão, podem representar agregados do conjugado. As estruturas celulares podem aparecer acastanhadas (p.ex. os nucleólos), nomeadamente em caso de preparados antigos ou preparados que tenham sido guardados junto com reagentes anti-descorantes. Destroços das células podem causar também artefactos verde-fluorescentes.

4.6.2 Exemplo 2

Apresenta-se uma fluorescência esverdeada muito frouxa dos núcleos celulares e/ou do citoplasma, cuja intensidade se situa abaixo de uma amostra fracamente positiva. A avaliação desta amostra decorre da melhor forma, se no procedimento de teste diário for sempre levada uma amostra de ANA positiva fraca, uma amostra de ANA negativa e uma amostra de ANA positiva forte como controlo.

4.7 Indeterminável

Qualquer outro padrão, que está relacionado com organitos ou estruturas subcelulares que ainda não estão integraos na taxonomia de classificação.

4.8 Anexo

Laboratórios que usem secções de tecido em criostato, p.ex. fígado ou rim de roedores, para o diagnóstico ANA, não conseguem detectar os seguintes padrões de fluorescência: núcleos celulares com salpicado polimorfo, padrão centrômero, múltiplos pontos nucleares, pontos nucleares enovelados (coiled body pattern), alguns padrões nucleares e a maioria dos padrões citoplasmáticos. Da mesma forma também não são detectados padrões do fuso mitótico. Os padrões mitocondriais podem ser reconhecidos na maior parte dos tecidos como padrão de salpicos grossos, que anteriormente eram detectados em secções de tecido renal de animais.

A ligeira fluorescência da membrana nuclear apresenta-se frequentemente com grande clareza em secções de fígado de rato. O título limite para ANA positivos em células HEp-2 situa-se habitualmente acima de 1:80, ao usar secções de tecido situa-se usualmente abaixo desse valor.

Frequentemente um soro apresenta diferentes padrões de fluorescência, p.ex. pontos nucleares múltiplos junto com um padrão mitocondrial (ambos são característicos da colangite biliar primária) e o padrão nuclear com salpicado pleomorfo junto com coloração homogénea do núcleo celular, salpicado grosso ou fino (característicos para o lúpus eritematoso sistémico). Do mesmo modo o padrão centrômero surge frequentemente junto com o padrão mitocondrial.

Deve ser apontado o facto de que alguns laboratórios e testes usam conjugados FITC, que são dirigidos contra todas as classes de imunoglobulina. O glossário aqui presente baseia-se nos resultados para conjugados específicos de IgG.

5. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

Testaram-se cento e trinta e oito amostras congeladas em dois lotes de reagentes de outra empresa e em dois lotes de ***AESKUSLIDES®***. As 118 amostras clínicas foram conservadas durante vários anos e representavam pacientes avaliados para doença reumática. Para além disso, incluíram-se adicionalmente vinte amostras de indivíduos saudáveis. As amostras de indivíduos saudáveis representavam uma população sem sintomas clínicos de doença reumática conhecidos. A comparação dos dois kits foi demonstrar a comparabilidade entre sistemas ANA HEp-2 de duas empresas diferentes, incluindo consistência de padrão.

a. Tabela 1: Conjunto de Dados Combinados de Intervalos de Dados

		Variável determinante		
		Positiva	Negativa	Total
AESKUSLIDES® ANA HEp-2	Positiva	116	0	116
	Negativa	0	22	22
	Total	116	22	138

Concordância % positiva = 116/116 = 100 % (95° % CI: 96,8 – 100 %)
Concordância % negativa = 22/22 = 100 % (95° % CI: 85,1 – 100 %)

b. Tabela 2: Variável Determinante de Comparação de Padrão de Conjunto de Dados Combinados vs Aesku

Padrão	n	Variável determinante	*AESKUSLIDES®*
Homogéneo	32	32	32
Salpicado	82	82	82
Nucleolar	20	20	20
Centrómero	6	6	6
Periférico	3	3	3
Membrana Nuclear	1	1	1

N =144[2]

As amostras clínicas representaram um espetro completo de doenças autoimunes, incluindo LES, Esclerodermia, Esclerodermia -CREST, síndrome de Sjogren, DMTC, Síndrome antifosfolipídicos, Artrite reumatoide, Polimiosite/dermatomiosite, LES induzido por medicamentos, etc.

5.1 Reprodutibilidade e Precisão

Testaram-se três LOTES diferentes de ***AESKUSLIDES®*** com 15 amostras de soro que abrangem o conjunto de padrões completo. Diluíram-se estas amostras de 1:40 até 1:10240 e analisou-se cada diluição com dois leitores independentes nos três LOTES. O critério de aceitação foi um desvio de intensidade de fluorescência de +/- 1. Cumpriram-se os critérios de aceitação para todas as amostras, diluições, LOTES e leitores independentes. A pedido, poderá obter dados mais pormenorizados.

[2] A discrepância entre N=138 da Tabela 1 e N=144 da Tabela 2 tem a sua origem no facto de algumas amostras não terem nenhum padrão (por ex., amostra n.º 5) e algumas amostras terem dois padrões (por ex., amostra n.º 2). A Tabela 2 refere-se apenas ao número de padrões.

6. FICHA DE INTERPRETAÇÃO DE DADOS

ANA HEp-2

Data:	Lote:
Lâmina n.º:	Operador:

Poço N.º	ID	Factor de diluição	F.I.	Cromossomas (mitose)	Nucleoplasma	Nucléolo	citoplasma	auto-anticorpos	observações
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									

7. CONTEÚDO DE KITS PADRÃO

		LÂMINAS				CONJUGADO			CONTROLO POSITIVO		
Ref. do kit	**Descrição do kit**	**Ref.**	**Poços**	**Revestido com**	**quantidade**	**Ref.**	**Descrição**	**quantidade**	**Ref.**	**Descrição**	**quantidade**
51.100	**ANA HEp-2** (12 poços)	**S51.100**	12	ANA-HEp-2 Cells	10	**C51.100**	IgG Revestimento azul: solução ligeiramente colorida a azul. Contém: BSA, Fluoresceína (FITC)-anticorpo marcado anti-humano	1x 4,8 ml	**PC51.100**	Controlo de padrão (Homogéneo) ANA Revestimento vermelho: solução incolor. Contém: soro humano (diluído), azido de sódio < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.101	**ANA HEp-2** (12 poços)					**C51.101**	IgG Revestimento azul: solução ligeiramente colorida a azul. Contém: BSA, Fluoresceína (FITC)-anticorpo marcado anti-humano (H+L)		**PC51.101**	Controlo de padrão (Homogéneo) ANA Revestimento vermelho: solução incolor. Contém: soro humano (diluído), azido de sódio < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.100. Bulk5	**ANA HEp-2** (12 poços) **Bulk kit**				50	**C51.100. Bulk**	IgG Revestimento azul: solução ligeiramente colorida a azul. Contém: BSA, Fluoresceína (FITC)-anticorpo marcado anti-humano	2x 10 ml	**PC51.100**	Controlo de padrão (Homogéneo) ANA Revestimento vermelho: solução incolor. Contém: soro humano (diluído), azido de sódio < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.101. Bulk5	**ANA HEp-2** (12 poços) **Bulk kit**					**C51.101. Bulk**	IgG Revestimento azul: solução ligeiramente colorida a azul. Contém: BSA, Fluoresceína (FITC)-anticorpo marcado anti-humano (H+L)		**PC51.101**	Controlo de padrão (Homogéneo) ANA Revestimento vermelho: solução incolor. Contém: soro humano (diluído), azido de sódio < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml

		LÂMINAS				CONJUGADO			CONTROLO POSITIVO		
Ref. do kit	**Descrição do kit**	**Ref.**	**Poços**	**Revestido com**	**quantidade**	**Ref.**	**Descrição**	**quantidade**	**Ref.**	**Descrição**	**quantidade**
51.180	**ANA HEp-2** (18 poços)	**S51.180**	18	ANA-HEp-2 Cells	10	**C51.100. Bulk**	IgG Revestimento azul: solução ligeiramente colorida a azul. Contém: BSA, Fluoresceína (FITC)-anticorpo marcado anti-humano	1x 10 ml	**PC51.100**	Controlo de padrão (Homogéneo) ANA Revestimento vermelho: solução incolor. Contém: soro humano (diluído), azido de sódio < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.181	**ANA HEp-2** (18 poços)					**C51.101. Bulk**	IgG Revestimento azul: solução ligeiramente colorida a azul. Contém: BSA, Fluoresceína (FITC)-anticorpo marcado anti-humano (H+L)		**PC51.101**	Controlo de padrão (Homogéneo) ANA Revestimento vermelho: solução incolor. Contém: soro humano (diluído), azido de sódio < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.180. Bulk5	**ANA HEp-2** (18 poços) **Bulk kit**				50	**C51.100. Bulk**	IgG Revestimento azul: solução ligeiramente colorida a azul. Contém: BSA, Fluoresceína (FITC)-anticorpo marcado anti-humano	3x 10 ml	**PC51.100**	Controlo de padrão (Homogéneo) ANA Revestimento vermelho: solução incolor. Contém: soro humano (diluído), azido de sódio < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.181. Bulk5	**ANA HEp-2** (18 poços) **Bulk kit**					**C51.101. Bulk**	IgG Revestimento azul: solução ligeiramente colorida a azul. Contém: BSA, Fluoresceína (FITC)-anticorpo marcado anti-humano (H+L)		**PC51.101**	Controlo de padrão (Homogéneo) ANA Revestimento vermelho: solução incolor. Contém: soro humano (diluído), azido de sódio < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml

NOTA: O conteúdo dos restantes componentes dos kits, ou seja, reagentes comuns (Ctrl. Neg., Meio de Montagem, etc.), está descrito abaixo na secção 8 CONTEÚDO DE REAGENTES COMUNS.

8. CONTEÚDO DE REAGENTES COMUNS

8.1 Reagentes Comuns

Ref. do kit	Quantidade	Ref.	Reagente	quantidade	Descrição	Pronto a usar
All kits	1x	**NCIFA**	Controlo Negativo	0,5 ml	Revestimento verde: solução incolor. Contém: soro humano (diluído), azido de sódio < 0,1 % (conservante)	SIM
All kits	1x	*** EBIFA**	Evans Blue 0,2 %	1,5 ml	Revestimento branco: solução colorida a azul Contém: PBS, Evans Blue. Dilua Evans Blue 0,2 % na relação 1:3000 em 1x WBIFA	NÃO
51.100; 51.101; 51.180; 51.181	1x	**MMIFA**	Meio de Montagem	8 ml	Validado para utilizar com HELMED® ou HELIOS® Revestimento branco: solução incolor. Contém: PBS, glicerina.	SIM
51.100.Bulk5; 51.101.Bulk5; 51.180.Bulk5; 51.181.Bulk5	3x	**MMIFA.Bulk**	Meio de Montagem	12 ml		
51.100; 51.101; 51.180; 51.181	1x	**WBIFA**	Tampão de lavagem (10x)	100 ml	Revestimento branco: solução incolor. Dilua o tampão concentrado na relação 1:10 em água destilada (por ex.: 100 ml + 900 ml). Contém: PBS, azido de sódio (conservante).	NÃO
51.100.Bulk5; 51.101.Bulk5; 51.180.Bulk5; 51.181.Bulk5	3x					
51.100; 51.101	1x	**SBIFA**	Tampão de Amostra (1x)	70 ml	Revestimento branco: solução incolor para a diluição de soros de doentes. Contém: PBS, azido de sódio (conservante).	SIM
51.100.Bulk5; 51.101.Bulk5	3x					
51.180; 51.181	1x			100 ml		
51.180.Bulk5; 51.181.Bulk5	3x					

As quantidades por kit são. (*) devem ser pedidos separadamente.

8.2 Materiais requeridos mas não fornecidos

1. Água destilada
2. Tubos de ensaio para diluição de amostra
3. Frasco graduado
4. Pipeta volumétrica
5. Temporizador
6. Microscópio de fluorescência com sistema FITC, (filtro de excitação de 490 nm, filtro de barreira de 510 nm)
7. Câmara de incubação
8. Cubeta
9. Seringas
10. Lamela (24 x 60 mm)
11. Espremer lavar garrafa

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

9. ARMAZENAMENTO E VALIDADE

Guarde todos os reagentes a 2-8 °C / 35,6-46,4 °F, protegidos de luz intensa. O prazo de validade de cada componente está indicado no respectivo rótulo. Não utilize reagentes após o prazo de validade.

Todos os reagentes e as lâminas devem ser guardados nas suas embalagens originais a 2-8 °C / 35,6-46,4 °F. Depois de preparadas, as soluções reconstituídas são estáveis durante pelo menos 1 semana a 2-8 °C / 35,6-46,4 °F.

Os reagentes e as lâminas devem ser utilizados apenas dentro do prazo de validade indicado em cada componente.

10. AVISOS E MEDIDAS DE PRECAUÇÃO

c. Risco para a saúde

ESTE PRODUTO DEVE SER EXCLUSIVAMENTE USADO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO. A aplicação tem de ser realizada por pessoal que tenha sido especialmente instruído e formado no uso de métodos de diagnóstico in vitro. Embora os reagentes contidos neste produto não sejam considerados particularmente tóxicos ou perigosos ao serem usados conforme as especificações, deve ser cumprido o seguinte para assegurar a máxima segurança do utente:

Recomendações e medidas de precauçã

Este kit contém componentes potencialmente perigosos. Embora estes reagentes do kit não sejam classificados como irritantes para os olhos e a pele, recomendamos que se evite o contacto com os olhos e a pele e que se use luvas descartáveis.

Todo o material de origem humana usado para alguns reagentes deste kit (por exemplo, controlos) foi testado por métodos aprovados e revelaram-se negativos para HBsAg, Hepatite C e VIH. Contudo, nenhum teste pode excluir com certeza definitiva a existência de agentes virais nesse material. Por isso, os controlos do kit e as amostras dos doentes devem ser considerados transmissores potenciais de doenças e manuseados segundo as prescrições legais nacionais.

O kit contém material de origem animal (BSA, Imunoglobulina) como mencionado na descrição do conteúdo, utilizar de acordo com as recomendações nacionais.

d. Avisos gerais

1. Nunca se deve pipetar com a boca. Ao trabalhar com o kit não se deve comer, nem beber, nem fumar.
2. Componentes individuais de diferentes cargas e estojos de teste não devem ser trocados, já que isso pode levar a adulteração dos resultados da medição.
3. Depois do seu emprego, voltar a fechar bem os frascos, para evitar contaminações bacterianas.
4. Pipetar todos os componentes sempre com seringas novas e estéreis.
5. Nunca exponha os diferentes componentes do kit a temperaturas superiores a 37 °C / 98,6 °F. (exceto MMIFA)
6. Nunca deixe as lâminas secar durante o procedimento do teste.
7. Nunca congele as lâminas!

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais, com base nas suas próprias técnicas, controlos, equipamento e população de doentes.

Um diagnóstico clínico definitivo não se deve basear somente nos resultados do teste realizado, mas deve ser elaborado pelo médico, tendo em conta todos os resultados clínicos e de laboratório.

Se os resultados da análise não estiverem em conformidade com os limites aceitáveis do material de controlo, o teste é considerado inválido, tendo que ser repetido. Verifique os seguintes pontos: Prazo de validade dos reagentes (preparados), condições de armazenamento, pipetas e outro material para execução, fotómetro, prazos de incubação e método de lavagem.

Se após ter verificado estes pontos não tiver detectado qualquer erro, favor entrar em contacto com o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

11. TOMADA DE AMOSTRAS, PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO

Recomenda-se a utilização de amostras de soro colhidas na altura. A extracção de sangue deve seguir as prescrições legais nacionais. Efectue as colheitas de sangue de forma asséptica.

Não utilize amostras de soro lipémicas, ictéricas, hemolizadas ou contaminadas por bactérias.

Os soros com partículas devem ser limpos com centrifugação de baixa velocidade (<1000 x g). As amostras de sangue devem ser colhidas em tubos limpos, secos e vazios. Após a separação, as amostras de soro devem ser utilizadas nas primeiras 8 horas, guardadas num local bem fechado até 2 semanas a 2-8 °C / 35,6-46,4 °F, ou, se for necessário um armazenamento mais prolongado, devem ser congeladas a -20 °C / -4 °F. Evite congelar e descongelar várias vezes.

12. PROCEDIMENTO DO TESTE

e. Preparação

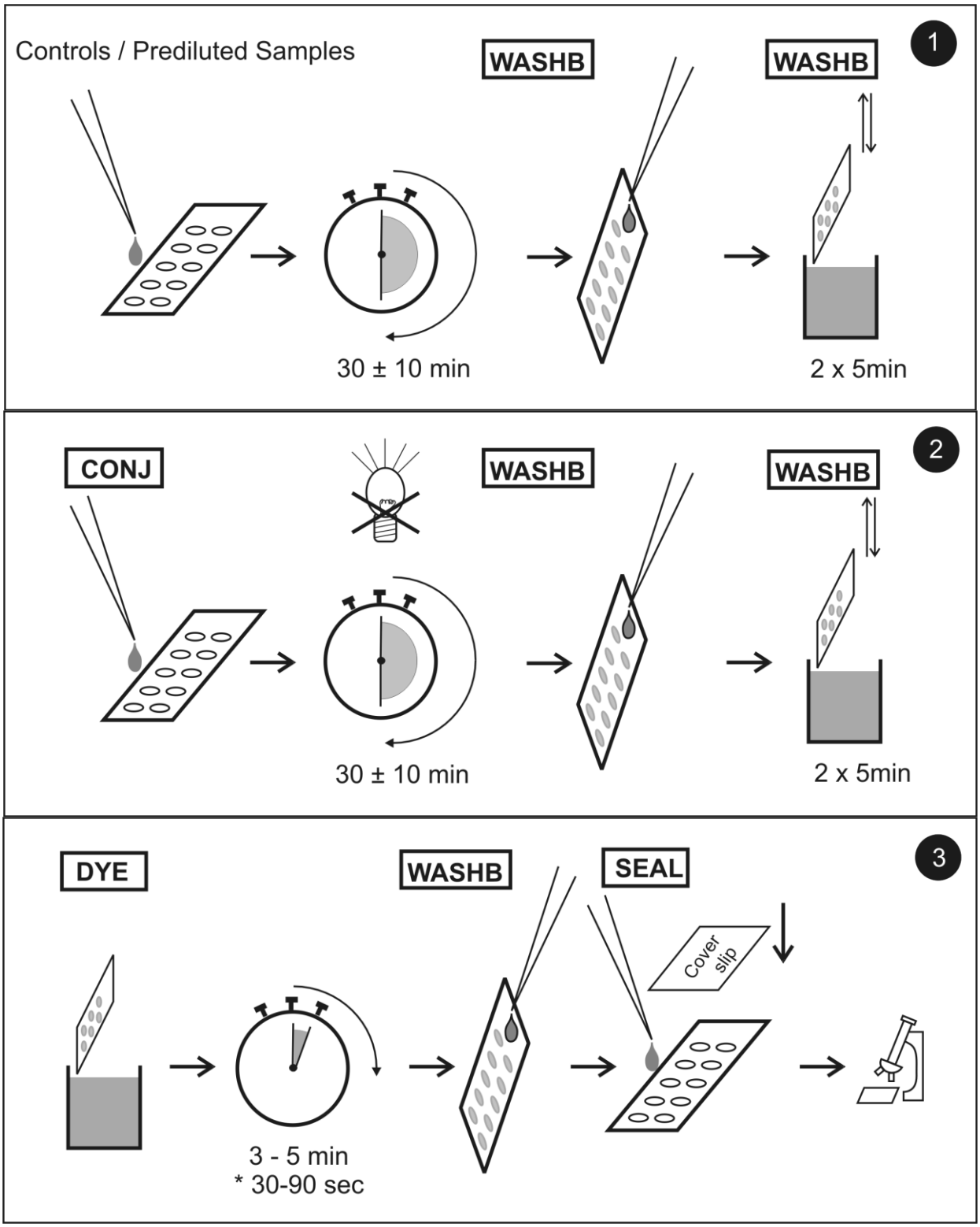
Todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (20–26 °C / 68–78,8 °F) antes do seu uso e ser bem agitados. Cumpre os tempos de incubação recomendados para obter um óptimo resultado do teste.

1. Preparação da tampão de lavagem: dilua o tampão concentrado na relação 1:10 em água destilada.
2. Diluição de amostras: dilua soro de doente (relativamente a título de despistagem consulte a secção ***Procedimento do Kit*** acima de acordo com a referência do produto que está a utilizar) com 1 x tampão da amostra. Estas variam entre kits HEp-2, nDNA, rLKS, EMA, etc.
3. Os controlos estão prontos a usar.
4. Preparar um protocolo: as fichas de interpretação de dados estão disponíveis na secção ***Procedimento do Kit*** acima de acordo com a referência do produto que está a utilizar.
5. Em caso de aumento da viscosidade e/ou opacidade, deve aquecer-se o reagente do Meio de Montagem (MMIFA) em banho-maria durante 15 minutos a 56 °C / 132,8 °F e depois deve deixar-se atingir a temperatura ambiente (20–26 °C / 68–78,8 °F) antes de utilizar-se. Após este procedimento, o reagente aquecido pode ser utilizado até 21 dias consecutivos, desde que seja armazenado entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F, conforme indicado no rótulo do reagente e nas instruções de utilização.

f. Realização do teste

N.º	Descrição do passo
1.	Retire a lâmina necessária para o teste da embalagem protectora, marcando-a. Evite o contacto com tecidos ou células revestidas. Nunca deixe secar a lâmina.
2.	**Preparação de Câmara de incubação:** Colocar uma pequena quantidade de água destilada numa câmara húmida e coloque a(s) lâmina(s) num suporte da câmara. Incubar a(s) lâmina(s) 30 ± 10 minutos numa câmara húmida, à temperatura ambiente. Utilizar tempos de incubação consistentes para o conjugado. **Primeira incubação:** Pipete um volume adequado de cada soro e dos controlos diluídos (prontos a usar) nos poços adequados; evite o contacto directo da pipeta com a superfície da lâmina. Evite um contacto directo da ponta da pipeta com a superfície da lâmina. Assegure-se de que cada poço de teste esteja coberto por completo com o soro correspondente, respectivamente com o controlo. Para esse efeito é importante usar tanto material de teste quanto seja necessário, contudo devendo evitar-se uma mesclagem das diferentes amostras de soro, porque isso pode levar a resultados errados.
3.	**Lavagem:** Após a incubação, retire as lâminas da câmara húmida e enxague-as brevemente com tampão de lavagem utilizando uma pipeta. Não incida o tampão de lavagem directamente nos poços. NOTA: Para evitar contaminação cruzada, incline a lamina para um dos lados e faca incidir cuidadosamente o tampão de lavagem ao longo da linha central da lâmina permitindo que o tampão de lavagem possa escorrer para fora da lâmina. De seguida, incline a lâmina para o outro lado e repita este mesmo procedimento. Lave as lâminas numa câmara de lavagem durante 10 minutos, com tampão de lavagem. Evitar o contacto directo com o substrato. Para obtenção de óptimos resultados é necessário mudar uma vez o tampão de lavagem, após 5 minutos. Retire a(s) lâmina(s) da câmara de lavagem e remova cuidadosamente o excesso de tampão de lavagem. NOTA: É importante que os poços da lâmina não sequem durante o procedimento, uma vez que poderá causar danos no substrato. É favor não secar a(s) lâmina(s) de nenhum modo, nem deixe que a lâmina e sem conjugado fluorescente durante mais do que alguns segundos.
4.	**Segunda incubação**: Depois da lavagem coloque a lâmina imediatamente na câmara húmida e cubra cada poço de teste com 30 µl do conjugado marcado com FITC pronto para usar. Incubar a(s) lâmina(s) 30 ± 10 minutos no escuro, à temperatura ambiente.
5.	**Lavar:** Após a incubação, retire as lâminas da câmara húmida e enxague-as brevemente com tampão de lavagem utilizando uma pipeta. Não incida o tampão de lavagem directamente nos poços. Lave a(s) lamina(s) numa câmara de lavagem durante 10 minutos, com tampão de lavagem. Para obtenção de óptimos resultados é necessário mudar uma vez o tampão de lavagem, após 5 minutos.
6.	***Contra-coloração opcional:** Dilua o reagente de contra-coloração (Evans Blue) na relação 1:3000 em tampão de lavagem, misturando bem. Encha o Evans Blue numa cubeta de coloração e incube aí as lâminas. Para obter mais pormenores sobre o tempo de incubação, consulte a secção do Procedimento do Kit acima de acordo com a referência do produto que está a utilizar. Evans Blue suprime uma fluorescência de fundo não específica. Retire a lâmina após o tempo de incubação, lavando-a brevemente em tampão de lavagem. Remova com cuidado o excedente residual de tampão de lavagem. É favor não colocar as lâminas sobre papel absorvente para blotting, da mesma forma estas também nunca devem ser sujeitas a uma secagem.
7.	**Montar**: Coloque uma quantidade suficiente de meio de montagem (Mounting Medium) ao longo da linha central sobre a lâmina. Deixe a lamela deslizar com cuidado sobre o meio de montagem, evitando ao mesmo tempo a formação de bolhas de ar.
8.	**Microscope:** as lâminas imediatamente com ampliação de 400 até 800 vezes com um microscópio de fluorescência (490 nm filtro de excitação, 510 nm filtro de barreira).

g. Fluxo de trabalho



13. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

ERRO	CAUSAS POSSÍVEIS	SOLUÇÃO
Densidade de células reduzida	• Rompimento da célula devido a contacto com água deionizada • Tampão directamente injectado nas células	Cumpra as condições de lavagem indicadas
	Enzimas proteolíticas atacaram as células	Desactive o soro
Fluorescência irregular	Soro secou nos poços de teste, fluorescência mais intensa nas bordas	Incube sempre em ambiente húmido
	Soro não cobre o poço de teste	Utilize um volume suficiente de material de teste
	Reacções cruzadas entre os poços de teste	Evite um derrame das amostras entre os poços de teste durante a primeira incubação
	Rotulagem da lâmina com um giz de cera produz um filme	Utilize um lápis
	Microscópio mal ajustado	Verifique o ajuste Verifique a durabilidade a lâmpada UV
Imagem difusa	Lâmina guardada no frigorífico sem cobertura	Sele a lamela de vidro com verniz para unhas ou cera parafínica
	Microscópio de imunofluorescência sujo. Possíveis riscos na lente	Limpe o microscópio conforme as instruções de serviço
Pouca ou nenhuma fluorescência	Conjugado e lâmina foram congelados e novamente descongelados	Guarde conjugados e lâminas a 2-8 °C / 35,6-46,4 °F
	Controlos foram diluídos	Verifique a instrução, utilize os controlos prontos para usar do kit
	• Contaminação bacteriana dos soros ou conjugados • Microscópio não ajustado • Valor pH do tampão de lavagem demasiado baixo (valor pH 7,4 ± 0,2)	Verifique as condições
	Conjugado FITC exposto a luz	Guardar conjugado protegido de exposição a luz
Fluorescência de fundo	• Incorrectamente lavado • Lâmina está seca • Soros lipémicos, hemolíticos • Erro do microscópio	• Verifique as especificações de lavagem • Nunca deixe a lâmina secar • Use soros frescos • Verifique os filtros / a lente

14. SÍMBOLOS REGULAMENTARES

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	- Cataloge number
	- Référence Catalogue	- Numéro de catálogo
	- Katalognummer	- Αριθμός παραγγελίας
	- Número de catálogo	
LOT	- Descrizione lotto	- Lot
	- Lot	- Lote
	- Chargen Bezeichnung	- Χαρακτηρισμός παρτίδας
	- Lote	
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo	- Unique device identifier
	- Identifiant unique de l'appareil	- Identificador único del dispositivo
	- eindeutige Produktidentifizierung	- Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	- Identificador único do dispositivo	
CE	- Conformità europea	- EC Declaration of Conformity
	- Déclaration CE de Conformité	- Declaración CE de Conformidad
	- Europäische Konformität	- Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- Declaração CE de conformidade	
eIFU WWW.AESKU.COM	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso	- See electronical instructions for use
	- Voir les instructions d'utilisation électronique	- Siga las instrucciones electrónicas de uso
	- Elektronsiche Gebrauchsanweisung beachten	- Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Seguir as instruções electrónicas de utilização	
	- Da utilizzarsi entro	- Use by
	- Utilise avant le	- Utilizar antes de
	- Verwendbar bis	- Χρήση μέχρι
	- Utilizar antes de	
+2°C +8°C	- Conservare a 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conserver à 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Conservar a 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Lagerung bei 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Φυλάσσεται στους 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conservar entre 2-8°C (35.6-46.4°F)	
	- Prodotto da	- Manufactured by
	- Fabriqué par	- Fabricado por
	- Hergestellt von	- Κατασκευάζεται από
	- Fabricado por	
DYE	- Colorante Blue-Evans	- Evans-Blue Dye
	- coloration au Bleu Evans	- Colorante Azul de Evans
	- Evans-Blue Färbelösung	- Evans Blue
	- Evans Blue	
CONTROL +	- Controllo positivo	- Positive Control
	- Contrôle Positif	- Control Positivo
	- Positiv Kontrolle	- Θετικός ορός ελέγχου
	- Controlo positivo	
CONTROL −	- Controllo negativo	- Negative Control
	- Contrôle Négatif	- Control Negativo
	- Negativ Kontrolle	- Αρνητικός ορός ελέγχου
	- Controlo negativo	
SEAL	- Mezzi di montaggio	- Mounting media
	- milieu de montage	- Medio de montaje
	- Mounting Medium	- Μέσο μονιμοποίησης
	- Meio de montagem	
CONJ	- Coniugato	- Conjugate
	- Conjugé	- Conjugado
	- Konjugat	- Σύζευγμα
	- Conjugado	
	- Vetrino per microscopio	- Microscope slide
	- lame de microscope	- Portaobjetos
	- Objektträger	- Αντικειμενοφόρο πλακίδιο
	- Lâmina	
WASHB 10x	- Tampone di lavaggio	- Wash Buffer
	- Tampon de Lavage	- Solución de lavado
	- Waschpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	- Solucão de lavagem	
SB 1x	- Tampone di campione	- Sample Buffer
	- Tampon de Echantillons	- Solución de muestras
	- Probenpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	- Solução para amostras	

	- Numero di determinazioni	- Number of determnations
	- Nombre de déterminations	- Número de determinaciones
	- Anzahl der Prüfungen	- Αριθμός προσδιορισμών
	- Número de determinações	
	- Non riutilizzare	- Do not reuse
	- Ne pas réutiliser	- No reutilizar
	- Nicht wiederverwenden	- Μην επαναχρησιμοποιείτε
	- Não reutilizar	
	- Proteggere dall'esposizione alla luce	- Protect from exposure to light
	- Protéger de l'exposition à la lumière	- Proteger de la exposición a la luz
	- Vor Sonnenlicht schützen	- Προστασία από την έκθεση στο φως
	- Proteger da exposição à luz	
	- Conservare all'asciutto	- Store dry
	- Stocker au sec	- Almacenar en seco
	- Trocken aufbewahren	- Αποθηκεύστε ξηρά
	- Armazenar em local seco	
	- Non utilizzare se la confezione è danneggiata e consultare le istruzioni per l'uso	- Do not use if package is damaged and consult instructions for use
	- Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter le mode d'emploi.	- No utilizar si el envase está dañado y consultar las instrucciones de uso
	- Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist, und Gebrauchsanweisung beachten	- Μην χρησιμοποιείτε εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά και συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης.
	- Não utilizar se a embalagem estiver danificada e consultar as instruções de utilização	