AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

AESKUSLIDES® ANCA

Ref 54.xxx

CE

AESKUSLIDES®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



eIFU
WWW.AESKU.COM

INSTRUÇÃO DE USO

ANCA

Ref.	Descrição	Testes
54.100	**ANCA Ethanol** (12 poços)	120
54.101	**ANCA Formalin** (12 poços)	120
54.050	**ANCA Ethanol** (6 poços)	60
54.051	**ANCA Formalin** (6 poços)	60

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 conteúdos

1. USO PRETENDIDO 1
2. APLICAÇÃO CLÍNICA 1
3. PROCEDIMENTO COM O KIT 3
4. INTERPRETAÇÃO 3
5. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS 3
5.1 Sensibilidade/especificidade 3
5.2 Reprodutibilidade e Precisão 4
6. FICHA DE INTERPRETAÇÃO DE DADOS 5
7. CONTEÚDO DO KIT PADRÃO 6
8. CONTEÚDO DE REAGENTES COMUNS 7
c. Reagentes Comuns 7
d. Materiais requeridos mas não fornecidos 7
9. ARMAZENAMENTO E VALIDADE 8
10. AVISOS E MEDIDAS DE PRECAUÇÃO 8
e. Risco para a saúde 8
f. Avisos gerais 8
11. TOMADA DE AMOSTRAS, PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO 9
12. PROCEDIMENTO DO TESTE 9
g. Preparação 9
h. Realização do teste 10
i. Fluxo de trabalho 11
13. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS 12
14. SÍMBOLOS REGULAMENTARES 13

ANCA

1. USO PRETENDIDO

***AESKUSLIDES*® ANCA** é uma amostra imunofluorescente indirecta para detectar auto-anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA) no soro humano.

A amostra é uma ferramenta para o diagnóstico diferencial de vasculite associada a ANCA (AAV), tal como granulomatose com poliangiite (de Wegener)[1], poliangiite microscópica e síndrome de Churg-Strauss.

2. APLICAÇÃO CLÍNICA

O acrónimo ANCA (Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies) descreve um grupo de anticorpos direccionados contra diferentes componentes de granulócitos e monócitos neutrofílicos. Para a detecção de ANCAs, o método estabelecido até agora tem sido o teste de imunofluorescência indirecta sobre neutrófilos fixados em etanol. Tornou-se aparente que alguns ANCAs criam um padrão fluorescente citoplasmático (o assim chamado C-ANCAs ou ANCAs tipo C) enquanto que outros criam um padrão perinuclear (as P-ANCAs ou ANCAs tipo P) em neutrófilos fixados em etanol. Sendo que ambos padrões podem cobrir diversos antígenos, a imunofluorescência não é suficiente para satisfazer um diagnóstico diferencial de vasculite; por isso cada teste de imunofluorescência (IFT) deveria ser verificado com testes ELISA específicos[2,3].

Alguns ANCAs dão origem a um padrão fluorescente atípico (o A-ANCA ou ANCA tipo A) que pode ser tecnicamente difícil de diferenciar de um padrão gerado por anticorpos anti-nucleares (ANA) em neutrófilos fixados em etanol. A fim de diferenciar estes, são empregados neutrófilos fixados com formalina. ANCAs que dão rigem a coloração de ANCA tipo P ou tipo em neutrófilos fixados em etanol mostrarão uma padrão citoplasmático quando neutrófilos fixados com formalina forem usados como substratos. Em caso da coloração tornar-se negativa, deve-se realizar um teste de ANAs com células Hep2.[4]

Mieloperoxidase (MPO) tem sido identificada como sendo o principal antígeno para P-ANCA (MPO-ANCA). Contudo, outros componentes celulares como lactoferrina, catepsina G, lisozima e elastase também causam uma coloração perinuclear, sendo portanto inclusas no grupo de P-ANCAs. Contudo, elas não são associadas especificamente com AAVs e podem ter uma função no diagnóstico diferencial de outras doenças não-vasculíticas.[5]

---

[1] Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman GS, Jayne DR, Jennette JC et al. Granulomatose com poliangiite (de Wegener): Um nome alternativo para a granulomatose de Wegener. Arthritis Rheum 2011; 63: 863-864.

[2] Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ et al. DEclaração de Consenso Internacional sobre testes e relatórios de anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA). Am J Clin Pathol 1999; 111: 507-513.

[3] Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC et al. Adenda à Declaração de Consenso Internacional sobre testes e relatórios de anticorpos citoplásmicos antineutrófilos. Directrizes para controlo de qualidade, comentários e recomendações para teste em outras doenças auto-imunes. Am J Clin Pathol 2003; 120: 312-318.

[4] Csernok E, Holle JU. Vinte e oito anos com anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA): Como testar ANCA – imunologia baseada em evidências? Autoimmun Highlights 2010; 1: 39-43.

[5] Wiik A, Stummann L, Kjeldsen L, Borregaard N, Ullman S, Jacobsen S et al. A diversidade dos antígenos para anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos perinucleares (pANCA). Clin Exp Immunol 1995; 101 Suppl 1: 15-17.

Em contraste, proteinase 3 é o principal antígeno-alvo das C-ANCAs (PR3-ANCA).[6] Outro antígeno que é capaz de produzir uma C-ANCA é o BPI (bactericidal/permeability-increasing protein = proteína bactericida/de aumento de permeabilidade).[7]

ANCAs são encontradas frequentemente em pacientes com poliangiite microscópica (60 % MPO-ANCA, 30 % PR3-ANCA) e em pacientes com síndrome de Churg-Strauss (30 % MPO-ANCA, 30 % PR3-ANCA).[8] Auto-anticorpos para PR3 são um marcador sorológico específico para granulomatose com poliangiite (de Wegener). Aqui, 50 % (doença localizada) a 95 % (doença generalizada) mostram PR3-ANCAs.[9]

Anticorpos contra outros antígenos relevantes em ANCAs, tais como lactoferrina, catepsina G, elastase e BPI, foram associados com uma vasta variedade de doenças. Contudo, uma clara importância clínica ainda está sendo investigada.[5] No caso de anticorpos de anti-elastase, foi mostrada uma correlação com lesões destructivas medianas induzidas por cocaína (CIMDL, cocaine-induced midline destructive lesions).[10]

Caracterização antígena: Neutrófilos humanos (granulócitos) fixados com etanol ou formalina

Reactividade cruzada: Como descrito na secção de aplicação clínica, a presença de ANAs pode gerar padrões fluorescentes que podem ser confundidos com uma P-ANCA/A-ANCA. Caso contrário, não há nenhuma reacção cruzada presente.

A detecção de anticorpos é baseada no princípio de amostra imunofluorescente indirecta (IIFA). Slides de vidro para microscópio são revestidos com segmentos tecidos ou céulas (células HEp-2 (ANA), granulócitos (ANCA) ou *Crithidia luciliae* (nDNA)). Se o soro do paciente contém anticorpos específicos, eles serão aglutinados na primeira incubação. Após remover material não aglutinado mediante estágios de lavagem, anticorpos aglutinados são detectados por imunoglobulinas anti-humanas conjugadas fluorescentes durante a segunda incubação. Uma coloração fluorescente específica de um complexo de anticorpos antígenos pode ser visualizado com ajuda de um microscópio fluorescente.

[6] Gross WL, Csernok E, Helmchen U. Anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos, auto-antígenos e vasculite sistêmica. APMIS 1995; 103: 81-97.
[7] Zhao MH, Jones SJ, Lockwood CM. A proteína bactericida/de aumento de permeabilidade (BPI) é um antígeno importante para auto-anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA) em vasculite. Clin Exp Immunol 1995; 99: 49-56.
[8] Bosch X, Guilabert A, Font J. Anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos. Lancet 2006; 368: 404-418.
[9] Holle JU, Csernok E, Gross WL. Granulomatose de Wegener. 2008; In: Critérios de diagnóstico em doenças auto-imunes, Shoenfeld Y, Cervera R, e Gershwin ME, eds. Humana Press, pp. 99-102.
[10] Wiesner O, Russell KA, Lee AS, Jenne DE, Trimarchi M, Gregorini G et al. Anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos reagindo com elastase neutrófila humana como um marcador de diagnóstico de lesões destructivas medianas induzidas por cocaína mas não vasculite auto-imuna. Arthritis Rheum 2004; 50: 2954-2965.

3. PROCEDIMENTO COM O KIT

Favor referir ao procedimento de teste enumerado no Manual Comum, Secção 12, para instruções detalhadas. Os seguintes detalhes devem ser usados para os kits de ANCA:

- Tempo de coloração do contador: 30 a 90 segundos
- Titer de triagem recomendado:
  - 1:20

4. INTERPRETAÇÃO

Anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA) são de grande importância clínica para assessar doenças vasculares em pacientes.

O titer final apropriado é aquele no qual o soro do paciente indica uma simples fluorescência positiva. Fluorescências fracas com titers entre 1:20 e 1:80 de imprecisão com respeito aos resultados clínicos devem ser verificados por meio de controlo monitorado. Em tais casos, as amostras devem ser colectadas aprox. a cada 3 semanas e testadas igualmente.

1:20	25 µL soro	+	475 µL tampão da amostra
1:40	20 µL soro	+	780 µL tampão da amostra (respectivamente 1:2 da solução "1:20")
1:80	10 µL soro	+	790 µL tampão da amostra (respectivamente 1:2 da solução "1:40")
1:160	10 µL soro	+	1590 µL tampão da amostra (respectivamente 1:2 da solução "1:80")

etc.

O padrão clássico de C-ANCA mostrando coloração citoplasmática homogénea granular com coloração mínima da área nuclear.

Padrão P-ANCA mostrando coloração perinuclear bem contrastada (neutrófilos fixos com etanol) ou padrão citoplasmático C-ANCA (neutrófilos fixos com formalina).

5. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

5.1 Sensibilidade/especificidade

O ***AESKUSLIDES***® **ANCA Ethanol** e o **ANCA Formalin** foram comparados com outros sistemas de teste de imunofluorescência indireta disponíveis no mercado utilizando neutrófilos fixados em etanol e formol. 132 soros de pacientes com vasculite associada a ANCA e 375 soros de pacientes com outras doenças (controlos não saudáveis) foram analisados manualmente e avaliados por dois leitores. Foi utilizada uma diluição de corte de 1:20 para determinar amostras positivas. As amostras clínicas representaram um espetro completo de doenças autoimunes.

Na comparação com ANCA Ethanol obtivemos os seguintes resultados:

		Variável determinante		
		Positivo	Negativo	Total
AESKUSLIDES® ANCA Ethanol	Positivo	145	34	179
	Negativo	71	257	328
	Total	216	291	507

Sensibilidade = 145/216 = 67,1 % (IC de 95 %: 60,6 - 73,0 %)
Especificidade = 257/291 = 88,3 % (IC de 95 %: 84,1 - 91,5 %)

Na comparação com ANCA Formalin obtivemos os seguintes dados:

		Variável determinante		
		Positivo	Negativo	Total
AESKUSLIDES® ANCA Formalin	Positivo	66	35	101
	Negativo	16	390	406
	Total	82	425	507

Sensibilidade = 66/82 = 80,5 % (IC de 95 %: 70,6 - 87,6 %)
Especificidade = 390/425 = 91,8 % (IC de 95 %: 88,8 - 94,0 %)

Intervalos de confiança de 95 % são intervalos de confiança calculados de acordo com o método de score de Wilson[11].

5.2 Reprodutibilidade e Precisão

Foram realizados estudos entre lotes dentro de e entre laboratórios para demonstrar a reprodutibilidade de ***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** e **ANCA Formalin**. Foram analisadas oito amostras de soro em ***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol**. Para o ***AESKUSLIDES*® ANCA Formalin** foram utilizadas dez amostras. O conjunto de amostras, incluindo amostras negativas, baixas, médias e altamente positivas representando dois padrões diferentes (P-ANCA e C-ANCA), foi processado manualmente e pelo **HELIOS® Automated IFA System**, e foi avaliado por dois leitores. Para os estudos dentro de e entre laboratórios, as amostras foram testadas em cinco dias, com duas séries por dia e três réplicas por série, em três locais do estudo. Para demonstrar as variabilidades entre lotes, as amostras de ***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** e **ANCA Formalin** foram testadas em dez réplicas em três lotes de kits diferentes. As concordâncias positivas e negativas foram de ≥ 90 %. As amostras apresentaram padrões e intensidades de fluorescência consistentes em todos os poços testados.

[11] Wilson, E. B. (1927). Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. Journal of the American Statistical Association, 22(158), 209–212. https://doi.org/10.2307/2276774

6. FICHA DE INTERPRETAÇÃO DE DADOS

ANCA

Data:	Lote:	Fixação etanol: ☐ formalina: ☐
Nº do slide:	Operador:	

Nº da amostra	ID	Factor de diluição	F.I.	nucleoplasma	citoplasma	auto-anticorpos	comentários
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							

7. CONTEÚDO DO KIT PADRÃO

		SLIDES				CONJUGADO			CONTROLO POSITIVO		
Kit Ref.	**Descrição do Kit**	**Ref.**	**Amostras**	**Revestido com**	**Quantidade**	**Ref.**	**Descrição**	**Quantidade**	**Ref.**	**Descrição**	**Quantidade**
54.100	**ANCA Ethanol (12 poços)**	**S54.100**	12	neutrófilos humanos (fixação com etanol)	10	**C54.100**	**IgG** Azul tampado: solução levemente azulada. Contendo: BSA, Tween, Fluoresceína (FITC)-anticorpo marcado anti-humano	1x 4,8 ml	**PC54.100**	Padrão de controlo ANCA, C-ANCA Vermelho tampado: solução sem cor. Contendo: Soro humano (diluído), azida sódica <0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
									PC54.101	Padrão de controlo ANCA, P-ANCA Vermelho tampado: solução sem cor. Contendo: Soro humano (diluído), azida sódica <0,1 % (conservante)	
54.101	**ANCA Formalin (12 poços)**	**S54.101**	12	neutrófilos humanos (fixação com formalina)	10	**C54.101**	**IgG** Azul tampado: solução levemente azulada. Contendo: BSA, Tween, Fluoresceína (FITC)-anticorpo marcado anti-humano	1x 4,8 ml	**PC54.100**	Padrão de controlo ANCA, C-ANCA Vermelho tampado: solução sem cor. Contendo: Soro humano (diluído), azida sódica <0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
									PC54.101	Padrão de controlo ANCA, P-ANCA Vermelho tampado: solução sem cor. Contendo: Soro humano (diluído), azida sódica <0,1 % (conservante)	
54.050	**ANCA Ethanol (6 poços)**	**S54.050**	6	neutrófilos humanos (fixação com etanol)	10	**C54.050**	**IgG** Azul tampado: solução levemente azulada. Contendo: BSA, Tween, Fluoresceína (FITC)-anticorpo marcado anti-humano	1x 2,4 ml	**PC54.100**	Padrão de controlo ANCA, C-ANCA Vermelho tampado: solução sem cor. Contendo: Soro humano (diluído), azida sódica <0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
									PC54.101	Padrão de controlo ANCA, P-ANCA Vermelho tampado: solução sem cor. Contendo: Soro humano (diluído), azida sódica <0,1 % (conservante)	
54.051	**ANCA Formalin (6 poços)**	**S54.051**	6	neutrófilos humanos (fixação com formalina)	10	**C54.051**	**IgG** Azul tampado: solução levemente azulada. Contendo: BSA, Tween, Fluoresceína (FITC)-anticorpo marcado anti-humano	1x 2,4 ml	**PC54.100**	Padrão de controlo ANCA, C-ANCA Vermelho tampado: solução sem cor. Contendo: Soro humano (diluído), azida sódica <0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
									PC54.101	Padrão de controlo ANCA, P-ANCA Vermelho tampado: solução sem cor. Contendo: Soro humano (diluído), azida sódica <0,1 % (conservante)	

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

c. Reagentes Comuns

Ref.	Reagente	Quantidade / volume		Descrição	Pronto a usar
NCANCA	Controlo Negativo	1x	0,5 ml	Revestimento verde: solução incolor. Contém: soro humano (diluído), azido de sódio < 0,1 % (conservante)	SIM
*** EBIFA**	Evans Blue 0,2 %	1x	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
MMIFA	Meio de Montagem	1x	8 ml	Validado para utilizar com HELMED® Revestimento branco: solução incolor. Contém: PBS, glicerina.	SIM
WBIFA	Tampão de lavagem (10 x)	1x	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
SBIFA	Tampão de Amostra	1x	70 ml	Revestimento branco: solução incolor. para a diluição dos soros de doentes Contém: BSA, PBS, azido de sódio (conservante).	SIM

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

d. 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

e. 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.

f. 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

g. Preparação

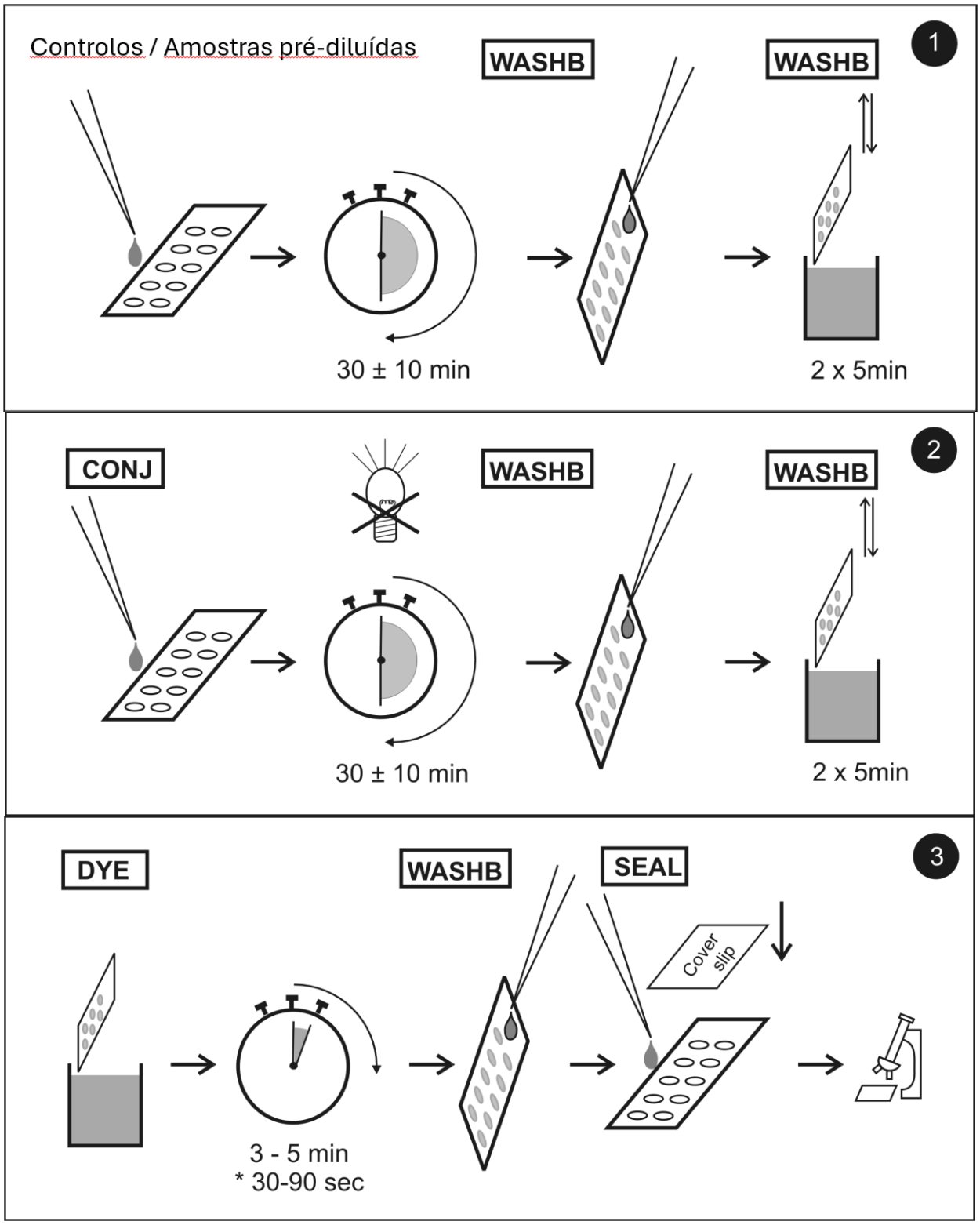
Todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (20-26 °C / 68-78,8 °F) antes do seu uso e ser bem agitados. Cumpre os tempos de incubação recomendados para obter um óptimo resultado do teste.

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 (20-22 °C / 68–71,6 °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.

h. 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).

i. 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	