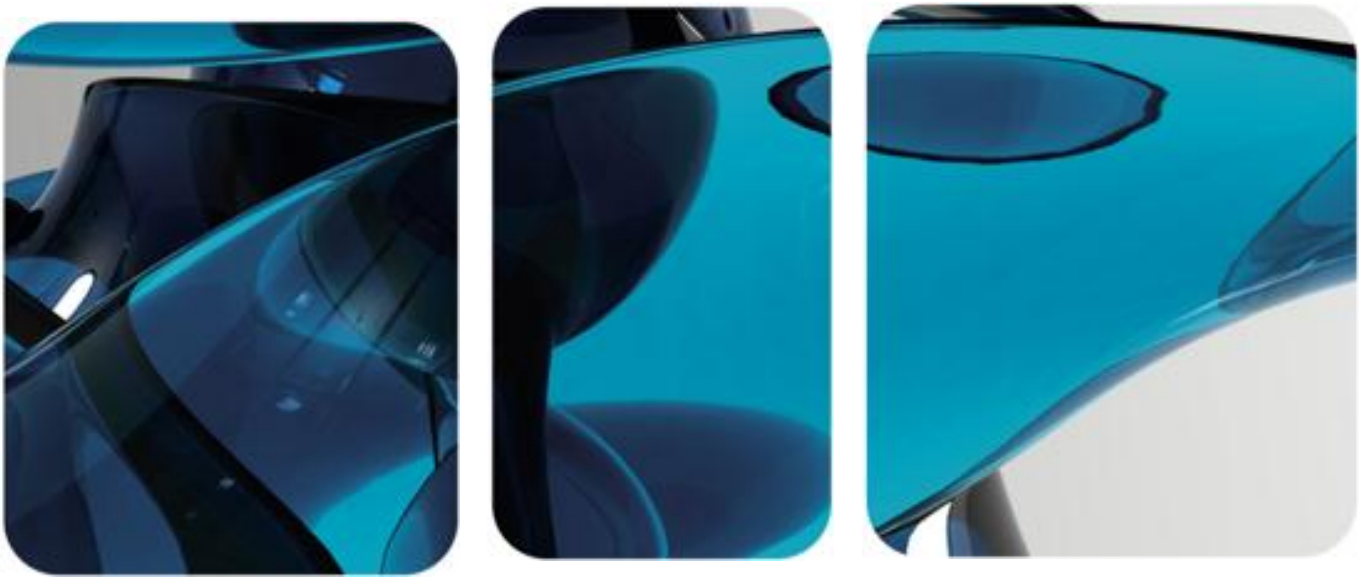
AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

MANUAL DE INSTRUCCIONES

AESKUSLIDES® ANCA

Ref 54.xxx

CE

AESKUSLIDES®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



eIFU
WWW.AESKU.COM

MANUAL DE INSTRUCCIONES

ANCA

Ref.	Descripción	Ensayos
54.100	**ANCA Ethanol** (12 pocillos)	120
54.101	**ANCA Formalin** (12 pocillos)	120
54.050	**ANCA Ethanol** (6 pocillos)	60
54.051	**ANCA Formalin** (6 pocillos)	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 contenidos

1. USO PREVISTO 1
2. APLICACIÓN CLÍNICA 1
3. PROCEDIMIENTO CON EL KIT 3
4. INTERPRETACIÓN 3
5. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE FUNCIONAMIENTO 3
   5.1. Sensibilidad/especificidad 3
   5.2. Reproducibilidad y precisión 4
6. HOJA DE INTERPRETACIÓN DE DATOS 5
7. CONTENIDO DEL KIT ESTÁNDAR 6
8. CONTENIDO DE REACTIVOS COMUNES 7
   a. Reactivos comunes 7
   b. Materiales necesarios no suministrados 7
9. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL 8
10. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES 8
   c. Riesgos para la salud 8
   d. Instrucciones generales 8
11. OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS 9
12. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO 10
   e. Preparación 10
   f. Procedimiento de la prueba 11
   g. Flujo de trabajo 12
13. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS 13
14. SÍMBOLOS REGLAMENTARIOS 14

ANCA

1. USO PREVISTO

***AESKUSLIDES*® ANCA** es una prueba de inmunofluorescencia indirecta para detectar autoanticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA) en suero humano.

La prueba es una herramienta para el diagnóstico diferencial de vasculitis asociadas a los ANCA (VAA) como la granulomatosis con poliangeítis (granulomatosis de Wegener),[1] la poliangeítis microscópica y el síndrome de Churg-Strauss.

2. APLICACIÓN CLÍNICA

El acrónimo ANCA (autoanticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos) describe un grupo de anticuerpos dirigidos contra diversos componentes de los monocitos y los granulocitos neutrófilos. La prueba de inmunofluorescencia indirecta sobre neutrófilos fijados en etanol ha sido hasta ahora el método establecido para la detección de los ANCA. Se ha observado que, con neutrófilos fijados en etanol, algunos ANCA presentan un patrón de fluorescencia citoplasmático (denominados por ello c-ANCA), mientras que otros presentan un patrón perinuclear (p-ANCA). Como ambos patrones pueden cubrir múltiples antígenos, la inmunofluorescencia no resulta suficiente para obtener un diagnóstico diferencial de vasculitis satisfactorio. Por tanto, cada prueba de inmunofluorescencia (IF) deberá contrastarse con pruebas específicas ELISA.[2,3]

Algunos ANCA presentan un patrón de fluorescencia atípico (el a-ANCA), que técnicamente puede resultar difícil de distinguir de un patrón generado por anticuerpos antinucleares (ANA) si se emplean neutrófilos fijados en etanol. Para ayudar a la diferenciación, se emplean neutrófilos fijados en formalina. Los ANCA que presentan una tinción p-ANCA/a-ANCA sobre neutrófilos fijados en etanol mostrarán un patrón citoplasmático cuando se empleen como sustrato neutrófilos fijados en formalina. En caso de que el patrón de tinción dé un resultado negativo, deberá realizarse una prueba con células Hep2 para la determinación de ANA.[4]

La mieloperoxidasa (MPO) ha sido identificada como el principal antígeno de los p-ANCA (MPO-ANCA). No obstante, otros componentes celulares como la lactoferrina, la catepsina G, la lisozima y la elastasa también presentan una tinción perinuclear y, por consiguiente, se incluyen en el grupo de los p-ANCA. Sin embargo, estos no están asociados específicamente con las VAA y pueden influir en el diagnóstico diferencial de otras enfermedades no relacionadas con la vasculitis.[5]

---

[1] Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman GS, Jayne DR, Jennette JC et al. Granulomatosis with Polyangiitis (Wegener's): An alternative name for Wegener's Granulomatosis. Arthritis Rheum 2011; 63: 863-864.

[2] Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). Am J Clin Pathol 1999; 111: 507-513.

[3] Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC et al. Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. Am J Clin Pathol 2003; 120: 312-318.

[4] Csernok E, Holle JU. Twenty-eight years with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): how to test for ANCA – evidence-based immunology? Autoimmun Highlights 2010; 1: 39-43.

[5] Wiik A, Stummann L, Kjeldsen L, Borregaard N, Ullman S, Jacobsen S et al. The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens. Clin Exp Immunol 1995; 101 Suppl 1: 15-17.

En cambio, la proteinasa 3 es el principal antígeno diana de los c-ANCA (PR3-ANCA).[6] Otro antígeno que puede presentar c-ANCA es la proteína inductora de la permeabilidad bacteriana (BPI).[7]

Los ANCA se detectan con frecuencia en pacientes con poliangeítis microscópica (MPO-ANCA en un 60 % y PR3-ANCA en un 30 %) y en pacientes con el síndrome de Churg-Strauss (MPO-ANCA en un 30 % y PR3-ANCA en un 30 %).[8] Los autoanticuerpos antiproteinasa 3 son un marcador serológico específico para la granulomatosis con poliangeítis (granulomatosis de Wegener). En este caso, entre el 50 % (enfermedad localizada) y el 95 % (enfermedad generalizada) presentan PR3-ANCA.[9]

Los anticuerpos contra los demás antígenos relevantes en los ANCA, como la lactoferrina, la catepsina G, la elastasa y la BPI, han sido asociados con una amplia variedad de enfermedades. No obstante, todavía se está investigando la existencia inequívoca de una relevancia clínica.[5] Por lo que respecta a los anticuerpos antielastasa, se ha observado una correlación con las lesiones destructivas de la línea media facial por cocaína.[10]

Caracterización del antígeno: Neutrófilos humanos (granulocitos) fijados en etanol o en formalina.

Reacciones cruzadas: Según la descripción proporcionada en la sección de aplicación clínica, la presencia de ANA puede dar lugar a patrones de fluorescencia susceptibles de confundirse con p-ANCA/a-ANCA. Por lo demás, no existe ninguna otra reacción cruzada.

La detección de anticuerpos está basada en el principio de la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los portaobjetos de vidrio para microscopio están cubiertos con cortes de tejido o células (células HEp2 –ANA-, granulocitos –ANCA- o *Crithidia luciliae* –nDNA-). Si el suero del paciente contiene anticuerpos específicos, estos se unirán durante la primera incubación. Tras retirar el material libre mediante varios pasos de lavado, los anticuerpos unidos se detectan durante la segunda incubación empleando anti-inmunoglobulina humana conjugada con fluoresceína. Con un microscopio de fluorescencia se puede observar la fluorescencia específica de color verde que presentan los complejos antígeno-anticuerpo.

[6] Gross WL, Csernok E, Helmchen U. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigens, and systemic vasculitis. APMIS 1995; 103: 81-97.

[7] Zhao MH, Jones SJ, Lockwood CM. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. Clin Exp Immunol 1995; 99: 49-56.

[8] Bosch X, Guilabert A, Font J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. Lancet 2006; 368: 404-418.

[9] Holle JU, Csernok E, Gross WL. Wegener Granulomatosis. 2008; In: Diagnostic Criteria in autoimmune Diseases, Shoenfeld Y, Cervera R, and Gershwin ME, eds. Humana Press, pp. 99-102.

[10] Wiesner O, Russell KA, Lee AS, Jenne DE, Trimarchi M, Gregorini G et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with human neutrophil elastase as a diagnostic marker for cocaine-induced midline destructive lesions but not autoimmune vasculitis. Arthritis Rheum 2004; 50: 2954-2965.

3. PROCEDIMIENTO CON EL KIT

Para obtener instrucciones detalladas consulte el Procedimiento del ensayo descrito en la sección 12, del Manual común. En los kits de ANCA se aplicarán los siguientes datos:

- Tiempo de contratinción: de 30-90 segundos
- Título de tamizaje recomendado:
  - 1:20

4. INTERPRETACIÓN

Los autoanticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA) poseen una importancia clínica de primer orden a la hora de evaluar los trastornos vasculares del paciente.

El título final adecuado es aquel en el que el suero del paciente muestra una fluorescencia positiva simple. La fluorescencia débil con títulos entre 1:20 y 1:80 o la vaguedad respecto a los resultados clínicos debe ser verificada mediante pruebas de control. En este caso las muestras deberán obtenerse aproximadamente cada 3 semanas y probarse de forma similar.

1:20	25 µL de suero	+	475 µL de solución tampón para muestra
1:40	20 µL de suero	+	780 µL de tampón para muestra (o bien 1:2 de la dilución 1:20)
1:80	10 µL de suero	+	790 µL de tampón para muestra (o bien 1:2 de la dilución 1:40)
1:160	10 µL de suero	+	1590 µL de tampón para muestra (o bien 1:2 de la dilución 1:80)

Etcétera.

El patrón c-ANCA clásico presenta una tinción granular homogénea del citoplasma con una coloración mínima del área nuclear.

El patrón p-ANCA muestra una tinción perinuclear muy definida (neutrófilos fijados en etanol) o el patrón citoplasmático c-ANCA (neutrófilos fijados en formalina).

5. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE FUNCIONAMIENTO

5.1. Sensibilidad/especificidad

***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** y **ANCA Formalin** se compararon con otros sistemas de análisis de inmunofluorescencia disponibles comercialmente utilizando neutrófilos fijados en etanol y en formalina. Se han analizado manualmente 132 sueros de pacientes diagnosticados con vasculitis asociada a ANCA y 375 sueros de pacientes con otras enfermedades (controles negativos de salud), y han sido evaluados por dos lectores. Se utilizó una dilución de corte de 1:20 para determinar las muestras positivas. Las muestras clínicas representaban la gama completa de enfermedades autoinmunitarias.

En la comparación para ANCA Ethanol obtuvimos los siguientes resultados:

		Kit de comparación		
		Positivo	Negativo	Total
***AESKUSLIDES*®** **ANCA Ethanol**	**Positivo**	145	34	179
	Negativo	71	257	328
	Total	216	291	507

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

En la comparación para ANCA Formalin obtuvimos los siguientes datos:

		Kit de comparación		
		Positivo	Negativo	Total
***AESKUSLIDES*®** **ANCA Formalin**	**Positivo**	66	35	101
	Negativo	16	390	406
	Total	82	425	507

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

Los intervalos de confianza del 95 % constituyen puntuaciones para los intervalos de confianza según el método de Wilson[11].

5.2. Reproducibilidad y precisión

Se realizaron estudios intralaboratorio, interlaboratorio e interlote para demostrar la reproducibilidad de ***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** y **ANCA Formalin**. Se sometieron a ensayo ocho muestras de suero en ***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol**. Para ***AESKUSLIDES*® ANCA Formalin** se utilizaron diez muestras. El conjunto de muestras, incluidas las negativas, bajas, medias y positivas altas, que representa dos patrones diferentes (P-ANCA y C-ANCA), se procesó manualmente y mediante el sistema IFA automatizado **HELIOS® Automated IFA System**, y fue evaluado por dos lectores. Para los estudios intralaboratorio e interlaboratorio se analizaron las muestras en cinco días, con dos sesiones al día y tres réplicas por sesión en tres centros de estudio. Para demostrar las variabilidades interlote, se sometieron a ensayo muestras ***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** y **ANCA Formalin** en diez réplicas y en tres lotes de kits diferentes. Las concordancias de positivos y negativos fueron ≥ 90 %. Las muestras presentaron patrones e intensidades de fluorescencia coherentes en todos los pocillos sometidos a ensayo.

[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. HOJA DE INTERPRETACIÓN DE DATOS

ANCA

Fecha:	Lote:	Fijación ethanol: ☐ formalin: ☐
Portaobjetos n.º:	Técnico:	

Pocillo nº	ID	Factor de dilución	I.F.	Nucleoplasma	Citoplasma	Autoanticuerpos	Observaciones
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							

7. CONTENIDO DEL KIT ESTÁNDAR

		PORTAOBJETOS				CONJUGADO			CONTROL POSITIVO		
Ref. de kit	**Descripción del kit**	**Ref.**	**Pocillos**	**Cubiertos con**	**Cantidad**	**Ref.**	**Description**	**Quantity**	**Ref.**	**Description**	**Quantity**
54.100	**ANCA Ethanol (12 pocillos)**	**S54.100**	12	Neutrófilos humanos (fijación con etanol)	10	**C54.100**	**IgG** Tapón azul: solución ligeramente azul. Contiene: BSA, Tween, Fluoresceína (FITC)-anti-humano marcado anticuerpo	1 x 4,8 ml	**PC54.100**	Control del patrón c-ANCA Tapón rojo: solución incolora Contiene: suero humano (diluido), azida sódica <0,1 % (conservante)	1 x 0,5 ml
									PC54.101	Control del patrón p-ANCA Tapón rojo: solución incolora Contiene: suero humano (diluido), azida sódica <0,1 % (conservante)	
54.101	**ANCA Formalin (12 pocillos)**	**S54.101**	12	Neutrófilos humanos (fijación con formalina)	10	**C54.101**	**IgG** Tapón azul: solución ligeramente azul. Contiene: BSA, Tween Fluoresceína (FITC)-anti-humano marcado anticuerpo	1 x 4,8 ml	**PC54.100**	Control del patrón c-ANCA Tapón rojo: solución incolora Contiene: suero humano (diluido), azida sódica <0,1 % (conservante)	1 x 0,5 ml
									PC54.101	Control del patrón p-ANCA Tapón rojo: solución incolora Contiene: suero humano (diluido), azida sódica <0,1 % (conservante)	
54.050	**ANCA Ethanol (6 pocillos)**	**S54.050**	6	Neutrófilos humanos (fijación con etanol)	10	**C54.050**	**IgG** Tapón azul: solución ligeramente azul. Contiene: BSA, Tween Fluoresceína (FITC)-anti-humano marcado anticuerpo	1 x 2,4 ml	**PC54.100**	Control del patrón c-ANCA Tapón rojo: solución incolora Contiene: suero humano (diluido), azida sódica <0,1 % (conservante)	1 x 0,5 ml
									PC54.101	Control del patrón p-ANCA Tapón rojo: solución incolora Contiene: suero humano (diluido), azida sódica <0,1 % (conservante)	
54.051	**ANCA Formalin (6 pocillos)**	**S54.051**	6	Neutrófilos humanos (fijación con formalina)	10	**C54.051**	**IgG** Tapón azul: solución ligeramente azul. Contiene: BSA, Tween Fluoresceína (FITC)-anti-humano marcado anticuerpo	1 x 2,4 ml	**PC54.100**	Control del patrón c-ANCA Tapón rojo: solución incolora Contiene: suero humano (diluido), azida sódica <0,1 % (conservante)	1 x 0,5 ml
									PC54.101	Control del patrón p-ANCA Tapón rojo: solución incolora Contiene: suero humano (diluido), azida sódica <0,1 % (conservante)	
NOTA: el contenido del resto de los componentes de los kits, es decir, reactivos comunes (control negativo, medio de montaje, etc.) se describe más adelante en la sección 8 CONTENIDO DE LOS REACTIVOS COMUNES											

8. CONTENIDO DE REACTIVOS COMUNES

a. Reactivos comunes

Ref.	Reactivo	Cantidad / Volumen		Descripción	Preparado para usar
NCANCA	Control negativo	1 x	0,5 ml	Tapón verde: solución incolora. Contiene: suero humano (diluido), azida sódica <0,1 % (conservante)	SÍ
*** EBIFA**	Azul de Evans 0,2 %	1 x	1,5 ml	Tapón blanco: solución de color azul Contiene: PBS, azul de Evans. Diluya el azul de Evans 0,2 % a 1:3000 en 1 WBIFA	NO
MMIFA	Medio de montaje	1 x	8 ml	Validado para su uso con HELMED® Tapón blanco: solución incolora. Contiene: PBS, glicerina.	SÍ
WBIFA	Solución de tampón para lavado (10x)	1 x	100 ml	Tapón blanco: solución incolora. Diluya la solución de tampón concentrada a 1:10 en agua destilada (por ejemplo: 100 ml + 900 ml). Contiene: PBS, azida sódica (conservante).	NO
SBIFA	Solución de tampón para muestra	1 x	70 ml	Tapón blanco: solución incolora. para la dilución de los sueros de paciente Contiene: BSA, PBS, azida sódica (conservante).	SÍ

Las cantidades son por kit. (*) debe pedirse por separado.

b. Materiales necesarios no suministrados

1. Agua destilada
2. Tubos de ensayo para dilución de muestras
3. Frasco para medición
4. Pipeta volumétrica
5. Temporizador
6. Microscopio de fluorescencia con sistema FITC, (filtro de excitación de 490 nm, filtro de barrera de 510 nm)
7. Bandeja de incubadora
8. Plato de tinciones
9. Puntas de pipeteado
10. Cubreobjetos (24 x 60 mm)
11. exprimir frasco lavador

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

9. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

Almacene todos los reactivos entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F, protegidos de la luz intensa. La fecha de caducidad de cada componente se indica en la etiqueta correspondiente. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.

Almacene todos los reactivos y los portaobjetos entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F, en los contenedores originales. Una vez preparadas, las soluciones reconstituidas permanecen estables durante al menos una semana a una temperatura entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F. **Los reactivos y los portaobjetos deben usarse sólo antes de la fecha de caducidad que figura en cada componente.**

10. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

c. Riesgos para la salud

ESTE PRODUCTO DEBE UTILIZARSE SÓLO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO. Sólo el personal capacitado y específicamente informado sobre métodos de diagnóstico in vitro puede usar el kit. Los reactivos contenidos en este producto no se consideran tóxicos ni peligrosos cuando se usan según las instrucciones; a pesar de ello, para garantizar la máxima seguridad para el usuario respete las siguientes:

Recomendaciones y precauciones

Este kit contiene reactivos potencialmente peligrosos. Aunque los reactivos del kit no están clasificados como irritantes de la piel y los ojos, se recomienda evitar el contacto con los mismos y usar guantes desechables.

Todo el material de origen humano utilizado para algunos de los reactivos de este kit (por ejemplo, controles) se ha analizado mediante métodos aprobados y ha resultado negativo para HbsAg, hepatitis C y VIH. Sin embargo, en el caso de material de origen humano, no se puede garantizar la ausencia completa de virus. Por consiguiente, los controles del kit y las muestras de pacientes deben considerarse potencialmente infecciosos y deben manipularse de acuerdo con los requisitos nacionales.

El kit contiene material de origen animal (BSA, Inmunoglobulina) como se indica en la tabla de contenidos, proceda de acuerdo con la normativa de su país.

d. Instrucciones generales

1. No pipetee con la boca. No fume, coma ni beba mientras trabaja con el kit.
2. No mezcle reactivos ni instrumental provenientes de diferentes números de lote. Esto puede conducir a alteraciones en los resultados de la prueba.
3. Mantenga todos los recipientes herméticamente cerrados después de usarlos, para evitar la contaminación bacteriana.
4. Siempre use puntas para pipeta estériles y nuevas para todos los componentes.
5. Nunca exponga los componentes a temperaturas superiores a 37 °C / 98,6 °F (excepto el MMIFA).
6. Nunca deje secar los portaobjetos durante el procedimiento.
7. Nunca congele los portaobjetos.

Se aconseja que cada laboratorio establezca sus propios valores normales, de acuerdo con sus propias técnicas, controles, equipos y población de pacientes.

No puede hacerse un diagnóstico clínico definitivo sólo sobre la base de los resultados del análisis efectuado, sino que debe ser realizado por el médico después de evaluar todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

Si los resultados del ensayo no se encuentran en el intervalo aceptable de los controles, el test no es válido y debe repetirse. Debe comprobar lo siguiente: fecha de caducidad de los reactivos (preparados), condiciones de conservación, pipetas y cualquier otro material utilizado, fotómetro, tiempos de incubación y métodos de lavado. Si tras comprobar los aspectos previos no ha detectado ningún error, le rogamos que contacte con el fabricante o su proveedor.

11. OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Preparación de las muestras: Se recomienda usar muestras de suero recién obtenidas. La extracción de sangre debe hacerse observando los requisitos nacionales. Tome las muestras de sangre de forma aséptica.

No usar muestras lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas con bacterias.

Se debe eliminar el material particulado del suero por centrifugación a baja velocidad (<1000 x g). Las muestras de sangre deben recogerse en tubos limpios, secos y vacíos. Después de la separación, las muestras de suero deben usarse directamente durante las primeras 8 horas, almacenarse bien cerradas entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F por un máximo de 2 semanas o congelarse a -20 °C / -4 °F para conservarlas durante periodos más prolongados. Evite los ciclos repetidos de congelación y descongelación.

12. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

e. Preparación

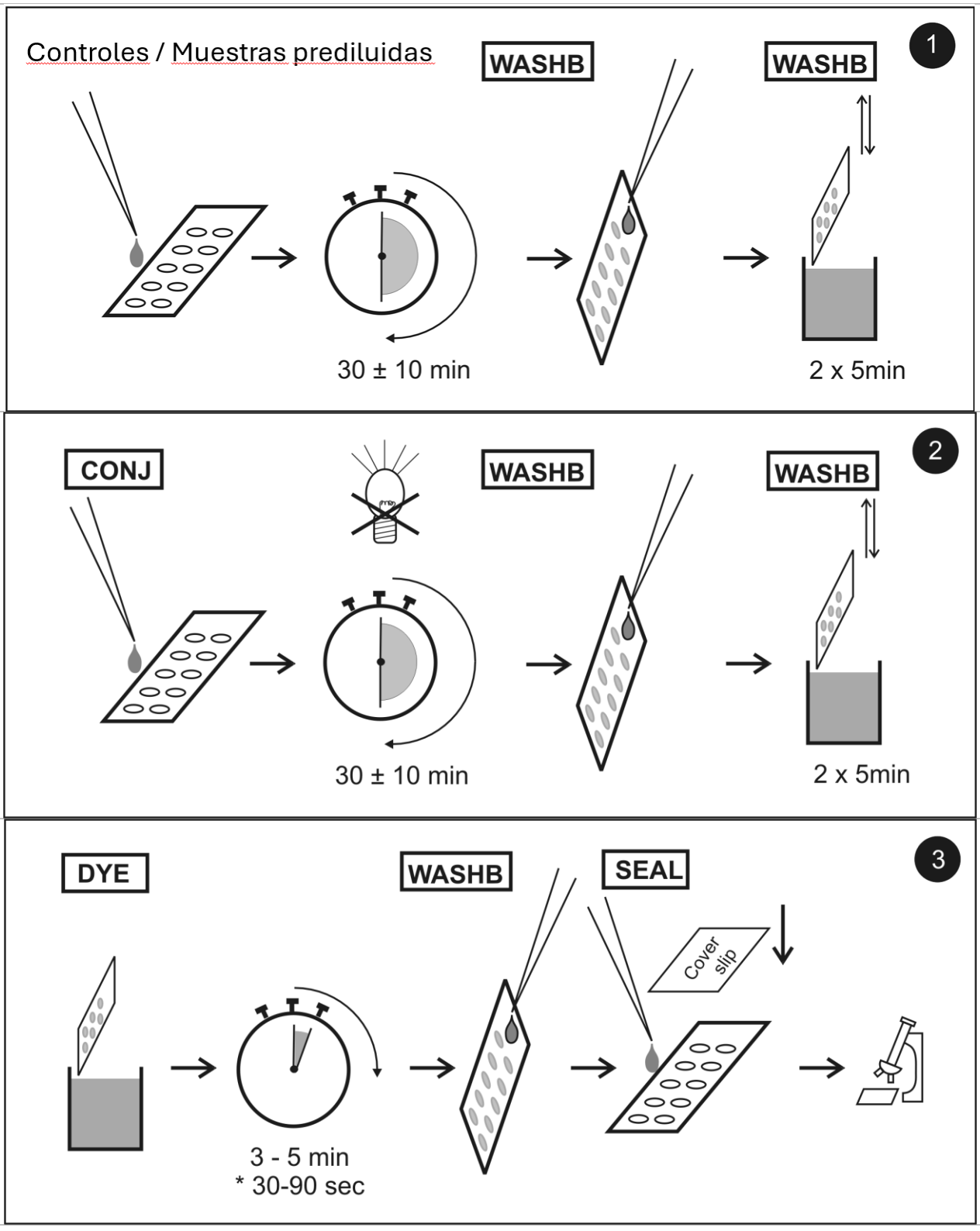
Deje que todos los componentes lleguen a temperatura ambiente (20-26 °C / 68-78,8 °F) antes de usarlos, mézclelos bien y siga el esquema de incubación recomendado para obtener un rendimiento óptimo de la prueba.

1. Preparación de la solución de tampón para lavado: diluya la solución de tampón concentrada a 1:10 con agua destilada.
2. Dilución de las muestras: diluya el suero del paciente (para ver el título de tamizaje, consulte la sección ***Procedimiento con el kit*** anterior, de acuerdo con la referencia de producto que esté utilizando) con 1 solución de tampón para muestra. Varían entre los kits de HEp-2, ADNn, rLKS, EMA, etc.
3. Los controles están listos para usarse.
4. Preparación de un protocolo: las hojas de interpretación de datos están disponibles en la sección ***Procedimiento con el kit*** de acuerdo con la referencia del producto que esté utilizando.
5. En caso de aumento de la viscosidad o la opacidad, el reactivo de medio de montaje (MMIFA) debe calentarse en un baño de agua durante 15 minutos a 56 °C / 132,8 °F y después debe dejarse que alcance la temperatura ambiente (20–26 °C / 68–78,8 °F) Tras este procedimiento, el reactivo calentado se puede utilizar hasta 21 días consecutivos, suponiendo que se almacene a entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F, como se indica en la etiqueta del reactivo y en las instrucciones de uso.

f. Procedimiento de la prueba

N.º	Descripción del paso
1.	Extraiga los portaobjetos necesarios de sus envases y rotúlelos. No toque la capa de tejidos o células. Nunca deje secar los portaobjetos.
2.	**Preparación de la bandeja de la incubadora:** Coloque una pequeña cantidad de agua desionizada o destilada en una cámara de incubación y coloque las láminas sobre los soportes adecuados dentro de ésta. Incube la lamina (s) 30 ± 10 minutos a temperatura ambiente en la cámara de incubación húmeda. Utilice tiempos de incubación consistentes con el conjugado. **Primera incubación:** Pipetee un volumen adecuado de cada suero diluido y controles (listos para usarse) en los pocillos adecuados. Evite el contacto directo de la pipeta con la superficie del portaobjetos. Asegúrese de que cada área de prueba quede cubierta por completo con el suero o el control correspondientes. Es importante usar la cantidad de material a probar suficiente para cubrir por completo cada pocillo. Pero debe evitarse que se mezclen entre ellos, ya que esto puede producir resultados incorrectos.
3.	**Lavado**: Después de la incubación, remueva las láminas de la cámara de incubación y lávelas brevemente con tampón de lavado usando un frasco lavador. No aplique directamente el chorro del tampón sobre los pozos Nota: Para evitar contaminación cruzada, incline levemente la lámina primero hacia una fila y lave cuidadosamente con el chorro de tampón de lavado a lo largo de la línea media de la lámina, esto permite que el tampón de lavado salga fuera del borde inferior de la lámina. Luego incline la lámina hacia la otra fila, y repita este procedimiento con el tampón de lavado. Lave la lámina (s) 10 minutos con tampón de lavado en un plato de tinción de portaobjetos. Evite el contacto directo de los elementos sólidos con el sustrato. Para obtener resultados óptimos cambie la solución de tampón de lavado una vez, después de 5 minutos de incubación. Levante la lámina (s) del plato tinción y retire con cuidado el exceso de tampón de lavado. NOTA: Es importante que los pocillos del portaobjetos no se sequen durante el procedimiento, ya que eso puede provocar daños en el sustrato. Por favor,no seque el portaobjetos con papel absorbente ni de cualquier otra manera, no permita que la lámina quede sin reactivo de anticuerpos fluorescentes durante más de unos pocos segundos.
4.	**Segunda incubación**: Después del lavado, coloque los portaobjetos de inmediato en la cámara húmeda y cubra todas las zonas de prueba con una cantidad suficiente del conjugado marcado con FITC, de tal forma que la zona de prueba esté totalmente cubierta. Incube la lamina (s) 30 ± 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
5.	**Lavado:** Después de la incubación, remueva las láminas de la cámara de incubación y lávelas brevemente con tampón de lavado usando el frasco lavador. No aplique directamente el chorro del tampón sobre los pozos. Lave la lámina (s) 10 minutos con tampón de lavado en un plato de tinción de portaobjetos. Evite el contacto directo de los elementos sólidos con el sustrato. Para obtener resultados óptimos cambie la solución de tampón de lavado una vez después de 5 minutos de incubación.
6.	***Tinción de contraste optativa**: Diluya el colorante de contraste (azul de Evans) 1:3000 en tampón para lavado y mezcle bien. Vierta el colorante de contraste en un plato de tinciones e incube en él los portaobjetos. Consulte la sección Procedimiento con el kit anterior con la referencia del producto que esté usando para obtener detalles sobre el tiempo de incubación. El azul de Evans oculta la fluorescencia inespecífica de fondo. Retire los portaobjetos una vez transcurrido el tiempo de incubación y enjuáguelos brevemente con tampón de lavado. Elimine cuidadosamente el exceso de tampón de lavado. No seque los portaobjetos con papel absorbente; asimismo, nunca deben someterse a este tipo de secado.
7.	**Montaje**: Coloque un volumen adecuado de medio de montaje (Mounting Medium) a lo largo de la línea media del portaobjetos. Coloque cuidadosamente un cubreobjetos sobre el medio de montaje, evitando formar burbujas de aire.
8.	**Observación microscópica**: Lea los portaobjetos de inmediato con un aumento total de 400 a 800 x en un microscopio de fluorescencia (filtro excitador de 490 nm, filtro barrera de 510 nm).

g. Flujo de trabajo



13. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

ERROR	CAUSAS POSIBLES	SOLUCIÓN
Baja densidad celular	• Lisis celular por contacto prolongado con agua desionizada. • Tampón vertido directamente sobre las células	Observe el procedimiento de lavado
	Enzimas proteolíticas han atacado al sustrato	Inactive el suero
Fluorescencia irregular	El suero se ha secado en el pocillo, fluorescencia más intensa en los bordes	Incubar siempre en un medio ambiente húmedo
	El suero no cubrió el área de prueba	Coloque un volumen adecuado de material a probar
	Reacción cruzada entre áreas de prueba	Evite que se mezcle el contenido de las áreas de prueba durante la primera incubación Use un lápiz de grafito
	El rotulado del portaobjetos con un lápiz de cera produjo una película sobre el portaobjetos	Use un lápiz de grafito
	Microscopio regulado de forma incorrecta	Verifique la vida útil de la lámpara UV
Imagen difusa	Los portaobjetos se almacenaron en el refrigerador sin taparlos	Selle el portaobjetos con laca de uñas o cera de parafina
	El microscopio de fluorescencia está sucio. Posiblemente las lentes están rayadas	Limpie el microscopio de acuerdo con sus instrucciones de mantenimiento
Poca fluorescencia o ninguna	Conjugado y portaobjetos descongelados y vueltos a congelar	Almacenar el conjugado y los portaobjetos entre 2-8°C / 35-46°F.
	Controles diluidos	Lea las instrucciones, use los controles listos para usar del kit
	• Contaminación bacteriana de los sueros o del conjugado • Microscopio no regulado • pH del tampón de lavado demasiado bajo (pH 7,4 ± 0,2)	Verifique las condiciones de la prueba
	El conjugado FITC se ha expuesto a la luz	Almacene el conjugado protegido de la luz
Fluorescencia de fondo	• Lavado incorrecto • El portaobjetos se ha secado • Sueros lipémicos o hemolizados Error del microscopio	• Revise las instrucciones de lavado • No deje que los portaobjetos se sequen • Use sólo sueros recién obtenidos Verifique que el filtro y el objetivo sean los correctos

14. SÍMBOLOS REGLAMENTARIOS

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	