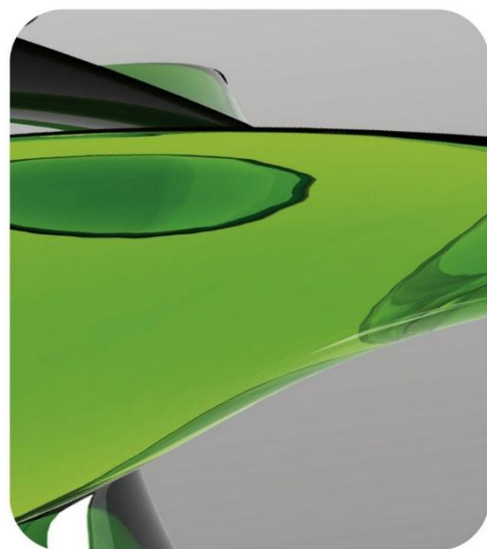




AESKU.DIAGNOSTICS

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKULISA[®]

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA[®] Parietal Cell

Ref 3511





Product Ref.	3511
Product Desc.	Parietal Cell
Manual Rev. No.	004: 2025-02-21

Manual de Instruções

Conteúdo

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



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

1 Utilização

AESKULISA® Parietal cell é um teste imunoenzimático em fase sólida com H⁺ / K⁺ ATPase nativa purificada para a determinação quantitativa e qualitativa singular de autoanticorpos no soro humano que são dirigidos contra células parietais.

Anticorpos contra células parietais encontram-se na anemia perniciosa.

2 Aplicações clínicas e princípio do ensaio

A anemia perniciosa, a causa mais frequente de carência de vitamina B12 na população ocidental, é caracterizada por lesões patológicas do fundus e do corpo do estômago. A atrofia da mucosa gástrica, a perda selectiva de células parietais e principais da mucosa e a infiltração linfocítica da submucosa é o quadro típico desta doença.

Característico é a ocorrência de autoanticorpos dirigidos contra a enzima transportadora de hidrogénio H⁺/K⁺ ATPase das células parietais gástricas. Esta enzima é responsável pela acidificação do lúmen do estômago. Os anticorpos anti-células parietais podem ser detectados por imunofluorescência indirecta em 80-90 % dos doentes com anemia perniciosa, contudo também se podem encontrar em 2-5 % de indivíduos saudáveis. Os sistemas de teste ELISA para a detecção destes autoanticorpos demonstram uma sensibilidade por volta de 80 % e uma especificidade que ronda os 90 %.

Princípio do teste

As provas de soro, diluídas a 1:101, são incubadas nos poços que estão revestidas com o antígeno específico. Neste passo os anticorpos específicos do soro do doente, se presentes, unem-se ao antígeno na placa; partes de soro não ligadas são eliminadas na etapa de lavagem seguinte. Depois são adicionadas imunoglobulinas anti-humanas, que se encontram marcadas com peroxidase de rábano (conjugado). Durante uma incubação elas unem-se ao complexo antígeno-anticorpo previamente formado, e as imunoglobulinas não ligadas são eliminadas na etapa de lavagem seguinte. A prova de anticorpos ligados efectua-se através de uma reacção colorimétrica (azul) enzimática do substrato, que é parada com ácido diluído (mudança da cor para amarelo). A intensidade de cor do cromogénio depende da quantidade de conjugado ligado ao complexo antígeno-anticorpo, sendo dessa forma directamente proporcional à concentração inicial dos respectivos anticorpos na amostra do paciente.



3 Componentes do Kit

DILUIR ANTES DE USAR				
Item	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição/Conteúdo
Tampão de amostra (5x)	1 x 20ml	Branco	Amarelo	concentrado 5x Tris, cloreto de sódio (NaCl), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Tampão de lavagem (50x)	1 X 20ml	Branco	Verde	concentrado 50x Tris, NaCl, Tween 20, azido de sódio < 0.1% (conservante)
PRONTO A USAR				
Item	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição/Conteúdo
Controlo negativo	1 x 1,5ml	Verde	Incolor	Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Controlo positivo	1 x 1,5ml	Vermelho	Amarelo	Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Calibrador Cut-off	1 x 1,5ml	Azul	Amarelo	Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Calibradores	6 x 1,5ml	Branco	Amarelo *	Concentração de cada calibrador: 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml. Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Conjugado, IgG	1 x 15ml	Azul	Azul	Contém: Imunoglobulinas anti-humanas marcadas com peroxidase de rábano, albumina de soro bovino (BSA)
Substrato TMB	1 x 15ml	Preto	Incolor	Tetrametilbenzidina estabilizada e peróxido de hidrogénio (TMB/H ₂ O ₂)
Solução de paragem	1 x 15ml	Branco	Incolor	Ácido clorídrico 1M
Microplaca	12x8 poços	N/A	N/A	Fraccionáveis. Revestimento ver ponto 1.
* Intensidade da cor aumenta com a concentração				
MATERIAIS NECESSÁRIOS				
Fotómetro para microplacas com filtro óptico para 450 nm, opcionalmente com filtro de referência opcional de 620 nm (600-690 nm). Material de vidro (cilindro 100-1000 ml), tubos de ensaio para as diluições. Agitador de tubos tipo Vortex, micropipetas (10,100, 200, 500, 1000 µl) ou multipipeta ajustável (100-1000µl). Aparelho de lavagem para microplacas (repetição 300 µl, pipeta multicanal ou sistema automatizado), papel de filtro. Os nossos testes foram concebidos para serem utilizados com água purificada segundo a definição da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP 26 – NF 21) e da Farmacopeia Europeia (Eur.Ph. 4. ^a ed.).				

4 Armazenamento e validade

Todos os reagentes e a microplaca devem ser guardados nas suas embalagens originais a 2-8 °C/35,6-46,4 °F. Soluções diluídas são estáveis durante 1 mês a 2-8 °C/35,6-46,4 °F. Devem ser cumpridas as datas de validade indicadas na embalagem e nos rótulos dos diferentes componentes.

Não usar componentes do kit que estejam fora do prazo de validade Evite a exposição da solução de substrato TMB a luz intensa. Guarde as microplacas sempre fechadas dentro da sua película de embalagem, junto com o dessecante.

5 Avisos e medidas de precaução

5.1 Risco para a saúde

ESTE PRODUTO DEVE SER USADO EXCLUSIVAMENTE 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. Apesar de este produto não ser considerado como particularmente tóxico ou perigoso em condições de utilização, ver o que se segue para máxima segurança:

Recomendações e medidas de precaução

Dado que alguns componentes do kit contêm reagentes potencialmente perigosos, estes podem causar uma irritação dos olhos e da pele.

ATENÇÃO: Calibradores, controlos e tampões contêm azida de sódio (NaN_3) como conservante. NaN_3 pode ter efeito tóxico, se for ingerido ou absorvido através da pele ou dos olhos. NaN_3 pode formar azidas metálicas altamente explosivas em contacto com canos de chumbo ou cobre. Para evitar concentrações de azida ao remover estas soluções deve-se passar com água em grande quantidade. É favor observar as prescrições locais/nacionais para descontaminação.

Ao trabalhar com o kit não comer, beber ou fumar. Não pipetar com a boca. Usar luvas descartáveis.

Os reagentes contidos neste produto, de origem humana (controlos e calibradores), demonstraram ser negativos após análise de antígeno de superfície da hepatite B (HbsAg), hepatite C e HIV 1 e 2. Contudo, em produtos de origem humana nunca se pode excluir com certeza definitiva a existência dos agentes patogénicos mencionados, outros ou de agentes eventualmente desconhecidos ou ainda não diagnosticados. Por isso os controlos, calibradores e soros dos doentes devem ser considerados transmissores potenciais de infeções e manuseados segundo as prescrições legais vigentes no seu país.

O kit contém material de origem animal conforme indicado no índice, manuseie segundo as prescrições legais vigentes no seu país.

5.2 Avisos gerais

Caso as informações sobre o produto, incluindo a rotulagem, tiverem erros ou estiverem incorrectas, contactar o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

Não misturar ou substituir controlos, calibradores, conjugados ou microplacas de diferentes números de lote. Isto pode levar a variações nos resultados.

Todos os componentes do kit devem atingir a temperatura ambiente (20-32 °C/68-89,6 °F) e ser bem agitados antes do teste.

É impreterível seguir o protocolo prescrito para a realização do teste.

Incubação: Para a realização automática de testes recomendamos uma temperatura de 30 °C/86 °F.

Nunca exponha os componentes do kit a temperaturas superiores a 37 °C/98,6 °F.

Pipete a solução de substrato sempre com pontas de pipeta novas para evitar contaminações. Proteja a solução de substrato de luz intensa. Nunca pipete o a solução do conjugado com pontas de pipeta que estejam contaminadas com outros reagentes.

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. O diagnóstico deve ser impreterivelmente confirmado com diferentes métodos diagnósticos.



6 Recolha da amostra, manipulação e armazenamento

Recomenda-se a utilização de amostras de soro colhidas na altura. A extracção de sangue deve seguir os requerimentos de protocolo do seu país. Não utilize amostras de soro ictéricas, lipémicas, hemolizadas ou contaminadas por bactérias.

Em caso de amostras turvas, as partículas devem ser centrifugadas a baixa velocidade ($<1000 \times g$). As amostras de sangue devem ser tomadas 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 48 horas a 2-8 °C/35,6-46,4 °F, se for necessário um armazenamento mais prolongado, devem ser congeladas a -20 °C/-4 °F.

7 Procedimento do teste

7.1 Preparação

Diluição de reagentes concentrados:

Dilua o tampão de amostra concentrado 1:5 com água destilada (p.ex. 20 ml mais 80 ml)

Dilua o tampão de lavagem concentrado 1:50 com água destilada (p.ex. 20 ml mais 980 ml).

Para evitar erros, sugerimos a marcação das tampas dos vários calibradores.

Diluição das amostras dos doentes:

Dilua e misture as amostras de soro 1:101 com tampão de amostra (1x),

p.ex. 1000 µl tampão de amostra + 10 µl de soro.

Lavagem:

São necessários 20 ml de tampão de lavagem diluído (1x) para 8 poços ou 200 ml para 96 poços p.ex. 4 ml de concentrado mais 196 ml de água destilada.

Lavagem automatizada:

Para a colocação em serviço do instrumento e o volume morto deve, ser consideradas quantidades adicionais de tampão de lavagem.

Lavagem manual:

Remova cuidadosamente o líquido ao bater a placa sobre papel filtrante. Pipete 300 µl de tampão de lavagem diluído em cada poço, espere 20 segundos. Repita o procedimento mais duas vezes.

Microplacas:

Retire os poços não usados, armazenando-os a 2-8 °C/35,6-46,4 °F de forma bem fechada dentro da película da embalagem, junto com o dessecante.

7.2 Schéma de pipetage

Sugerimos a pipetagem de calibradores, controlos e amostras da seguinte forma:

para interpretação quantitativa					para interpretação qualitativa				
	1	2	3	4...		1	2	3	4...
A	Cal A	Cal E	P1		A	NC	P2		
B	Cal A	Cal E	P1		B	NC	P2		
C	Cal B	Cal F	P2		C	CC	P3		
D	Cal B	Cal F	P2		D	CC	P3		
E	Cal C	PC	P3		E	PC	...		
F	Cal C	PC	P3		F	PC	...		
G	Cal D	NC	...		G	P1	...		
H	Cal D	NC	...		H	P1	...		

CalA: calibrator A

CalB: calibrator B

CalC: calibrator C

CalD: calibrator D

CalE: calibrator E

CalF: calibrator F

PC: positive control

NC: negative control

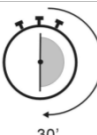
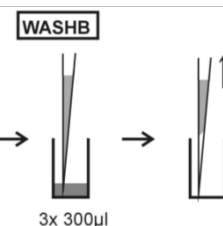
CC: cut-off calibrator

P1: patient 1

P2: patient 2

P3: patient 3

7.3 Passos de teste

Pas so	Descrição
1.	Verifique se as preparações do passo 7.1 acima foram realizadas antes da pipetagem.
2.	Utilize os passos que se seguem de acordo com os resultados de interpretação quantitativa/qualitativa pretendidos:
CONTROLOS E AMOSTRAS	
3.	 Pipete para os poços conforme descrito no ponto 7.2 acima, 100 µl de um dos seguintes: - Calibradores (CAL.A a CAL.F) para interpretação QUANTITATIVA ou - Calibrado Cut-off (CC) para interpretação QUALITATIVA e 100 µl de cada um dos seguintes: - Controlo negativo (NC) e Controlo positivo (PC) e - Soro diluído dos pacientes (P1, P2...)
4.	 Incube durante 30 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F.
5.	 Lave 3 vezes com 300 µl de tampão de lavagem 1:50 diluído.

CONJUGAR

6.

CONJ



Pipete 100 µl de conjugado em cada poço.

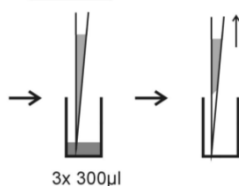
7.



Incube durante 30 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F.

8.

WASHB



Lave 3 vezes com 300 µl de tampão de lavagem 1:50 diluído.

SUBSTRATO

9.

SUB



Pipete 100 µl de substrato TMB em cada poço.

10.

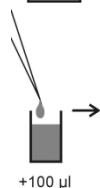


Incube durante 30 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F, protegida de luz intensa.

PARAGEM

11.

STOP



Pipete 100 µl da solução de paragem dentro de cada poço, na meParietal cella sequência da pipetagem do substrato.

12.

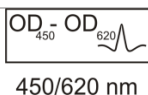


Incube durante 5 minutos, no mínimo.

13.

Agite cuidadosamente a placa durante 5 segundos.

14.



Leia a densidade óptica a 450 nm dentro de 30 minutos (recomendável a 450/620 nm).

8 Interpretação quantitativa e qualitativa

A **interpretação quantitativa** realiza-se com base numa curva padrão, em que a densidade óptica dos calibradores (eixo y) é traçada contra a concentração em U/ml (eixo x). É recomendada uma escala log/lin e um ajuste de 4 parâmetros para a interpretação. Com base na curva é determinada a concentração de anticorpos em U/ml a partir da densidade óptica da amostra.

Gama Normal	Duvidosos	Resultados positivos
< 12 U/ml	12 - 18 U/ml	>18 U/ml

Exemplo de interpretação

Este exemplo **NÃO** pode ser usado para interpretar os resultados dos pacientes

Calibradores IgG	DO 450/620 nm	CV % (Variância)
0 U/ml	0,042	0,4
3 U/ml	0,163	2,6
10 U/ml	0,307	0,2
30 U/ml	0,615	1,5
100 U/ml	1,275	4,3
300 U/ml	2,082	3,8

Exemplo de cálculo

Paciente	Replicado (OD)	Valor médio (OD)	Resultado (U/ml)
P 01	1,376/1,389	1,383	122,5
P 02	0,610/0,620	0,615	33,3

As amostras acima da gama do calibrador mais elevado devem ser referidas como >Max. Devem ser diluídas conforme necessário voltar a realizar o ensaio. As amostras abaixo da gama do calibrador devem ser referidas como < Min.

Consulte o certificado de controlo junto para dados específicos do lote. Laboratórios médicos devem realizar um controlo de qualidade interno, utilizando controlos próprios e/ou um „pool“ de soros interno segundo os regulamentos da UE.

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

No caso dos valores dos controlos não cumprirem os critérios, o teste é inválido e deverá ser repetido.

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

Se os itens testados mostrarem valores aberrantes ou qualquer tipo de desvio ou se os critérios de avaliação não forem cumpridos sem causa plausível, contactar o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

Na **interpretação qualitativa** efectua-se a comparação da densidade óptica (DO) da amostra dos doentes com a densidade óptica do calibrador cut-off. Se a densidade óptica da amostra do doente se situar na gama de +/-20% do calibrador cut-off, então deve ser considerada como valor limite. Em caso de uma DO mais elevada, a amostra do doente é considerada positiva, amostras com DOs mais baixas são consideradas negativas.

Negativo:	DO doente	<	0,8 x DO cut-off
Dudosos:	0,8 x DO cut-off	≤	DO doente ≤ 1,2 x DO cut-off
Positivo:	DO doente	>	1,2 x DO cut-off

9 Dados Técnicos

Amostra:	soro
Volume de amostra:	10 µl de amostra diluída a 1:101 com tampão de amostra 1x
Tempo total de incubação:	90 minutos à temperatura 20-32 °C/68-89,6 °F
Intervalo de calibração:	0-300 U/ml
Sensibilidade analítica:	1,0 U/ml
Armazenamento:	a 2-8 °C/35,6-46,4 °F utilize apenas os frascos originais
Número de determinações:	96 tests

10 Dados do teste / Características do teste

10.1 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica de **AESKULISA® Parietal Cell** de 1,0 U/ml foi determinada ao testar 30 vezes o tampão de amostra.

10.2 Especificidade e sensibilidade

A microplaca está revestida com H⁺/K⁺ ATPase purificada de mucosa suína. Não foram encontradas reactividades cruzadas com outros antígenos. Os anticorpos anti-células parietais podem ser detectados por imunofluorescência em 80-90 % dos doentes com anemia perniciosa, contudo também se encontram de 2-5 % de indivíduos saudáveis. Os sistemas de teste ELISA para a detecção destes autoanticorpos demonstram uma sensibilidade à volta de 80 % e uma especificidade a rondar os 90 %.

10.3 Linearidade

Foram analisados com este kit soros seleccionados e determinou-se que deviam diluir-se linearmente. No entanto, devido à natureza heterogénea dos auto-anticorpos humanos, podem existir amostras que não sigam esta regra.

Amostra No.	Factor de Diluição	Concentração medida (U/ml)	Concentração esperada (U/ml)	Recuperação (%)
1	1 / 100	194,0	183,0	106,0
	1 / 200	95,0	91,5	103,8
	1 / 400	44,0	45,8	96,1
	1 / 800	21,0	22,9	91,7
2	1 / 100	93,0	96,0	96,9
	1 / 200	44,0	48,0	91,7
	1 / 400	26,0	24,0	108,3
	1 / 800	11,0	12,0	91,7

10.4 Precisão

Para determinar a precisão do ensaio, avaliou-se a variabilidade (intra e inter-ensaio) através da análise da sua reproducibilidade em três amostras de soro. Estas amostras foram selecionadas para representar um intervalo acima da curva padrão.

Intra-Ensaio		
Amostra No.	Valor médio (U/ml)	CV (%)
1	191,0	4,1
2	90,0	3,2
3	33,0	4,5

Inter-Ensaio		
Amostra No.	Valor médio (U/ml)	CV (%)
1	195,0	4,5
2	96,0	3,1
3	36,0	2,8

10.5 Calibração

Devido à não existência de uma calibração de referência internacional, este ensaio está calibrado em unidades arbitrárias (U/ml).

11 Bibliografia

Gleeson PA, van Driel IR, Toh B-H (1996) Parietal cell autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y (eds.), Autoantibodies, pp 600-606, Elsevier, Amsterdam.

12 Símbolos regulamentares

IVD	- Diagnosi in vitro - Pour diagnostic in vitro - In Vitro Diagnostikum - Para uso Diagnóstico in vitro	- For in vitro diagnostic use - Para uso diagnóstico in vitro - In Vitro Διαγνωστικό μέσο
REF	- Numero d'ordine - Référence Catalogue - Bestellnummer - Número de catálogo	- Catalogue number - Número de catálogo - Αριθμός παραγγελίας
LOT	- Descrizione lotto - Lot - Chargen Bezeichnung - Lote	- Lot - Lote - Χαρακτηρισμός παρτίδας
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo - Identifiant unique de l'appareil - eindeutige Produktidentifizierung - Identificador único do dispositivo	- Unique Device Identifier - Identificador único del dispositivo - Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
CE	- Conformità europea - Déclaration CE de Conformité - Europäische Konformität - Declaração CE de Conformidade	- EC Declaration of Conformity - Declaración CE de Conformidad - Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- 96 determinazioni - 96 tests - 96 Bestimmungen - 96 Testes	- 96 tests - 96 pruebas - 96 προσδιορισμοί
	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso - Voir les instructions d'utilisation électronique - Elektronische Gebrauchsanweisung beachten - Seguir as instruções electrónicas de utilização	- See electronic instructions for use - Siga las instrucciones electrónicas de uso - Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Da utilizzarsi entro - Utiliser avant le - Verwendbar bis - Utilizar antes de	- Use by - Utilizar antes de - Χρήση μέχρι
	- Conservare a 2-8°C (35,6-46,4°F) - Conserver à 2-8°C (35,6-46,4°F) - Lagerung bei 2-8°C (35,6-46,4°F) - Conservar entre 2-8°C (35,6-46,4°F)	- Store at 2-8°C (35,6-46,4°F) - Conservar a 2-8°C (35,6-46,4°F) - Φυλάσσεται στους 2-8°C (35,6-46,4°F)
	- Prodotto da - Fabriqué par - Hergestellt von - Fabricado por	- Manufactured by - Fabricado por - Κατασκευάζεται από
CO-CAL	- Calibratore cut-off - Etalon Seuil - Grenzwert Kalibrator - Calibrador de cut-off	- Cut off Calibrator - Calibrador de cut-off - Οριακός ορός Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
CON +	- Controllo positivo - Contrôle Positif - Positiv Kontrolle - Controllo positivo	- Positive Control - Control Positivo - Θετικός ορός ελέγχου
CON -	- Controllo negativo - Contrôle Négatif - Negativ Kontrolle - Controllo negativo	- Negative Control - Control Negativo - Αρνητικός ορός ελέγχου
CAL	- Calibratore - Etalon - Kalibrator - Calibrador	- Calibrator - Calibrador - Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
CONJ	- Coniugato - Conjugué - Konjugat - Conjugado	- Conjugate - Conjugado - Σύζευγμα
MP	- Micropiastra rivestita - Microplaque sensibilisée - Beschichtete Mikrotiterplatte - Microplaca revestida	- Coated microtiter plate - Microplaca sensibilizada - Επικαλυμμένη μικροπλάκα
WASHB 50x	- Tampone di lavaggio - Tampon de Lavage - Waschpuffer - Solução de lavagem	- Wash buffer - Solución de lavado - Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
SUB	- Tampone substrato - Substrat - Substratpuffer - Substrato	- Substrate buffer - Tampón sustrato - Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP	- Reagente bloccante - Solution d'Arrêt - Stopreagenz - Solução de paragem	- Stop solution - Solución de parada - Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης
SB 5x	- Tampone campione - Tampon Echantillons - Probenpuffer - Diluente de amostra	- Sample buffer - Tampón Muestras - Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων