



IT

ASA (Esofago di Scimmia)

REF FA6001

IVD

Rx Only

Σ 80

CE

DESTINAZIONE D'USO

I kit per gli Anticorpi Anti-Epidermide (ASA) è progettato per la rilevazione qualitativa e semiquantitativa degli anticorpi associati al Pemfigo e al Pemfigoide Bolloso mediante la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta (IFA), ed è destinato all'uso diagnostico *in vitro*.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

La maggior parte delle autorità concorda sul fatto che gli studi sugli anticorpi nel siero di tutti i casi di sospetto Pemfigo Vulgaris (PV) e Pemfigoide Bolloso (BP) sono consigliabili (1 - 4). Gli anticorpi specifici sono dimostrabili praticamente in tutti i casi attivi, soprattutto se si eseguono test ripetuti durante le diverse fasi della malattia (1). Il substrato più frequentemente raccomandato per questi studi sugli anticorpi sierici è l'esofago di scimmia (6). Gli anticorpi specifici per PV e BP possono essere rilevati in un unico test utilizzando questo substrato. Gli anticorpi PV reagiscono con le sostanze intercellulari tra gli epitelii squamosi dell'esofago delle scimmie, mentre gli anticorpi BP reagiscono con la membrana basale dello strato di cellule epiteliali squamose (1, 4 e 6). La colorazione con anticorpi antinucleari dei nuclei delle cellule epiteliali squamose può verificarsi se il siero è ottenuto da pazienti con lupus sistemico o altri disturbi del tessuto connettivo (7). Una colorazione intercellulare distinta può essere rilevata nei casi di pemfigo vegetans, pemfigo foliaceo (compresa la forma brasiliana) e pemfigo eritematoso (1). Sebbene un singolo test sierologico non sia sufficiente per determinare il dosaggio della terapia farmacologica nella PV, un calo di due volte del titolo è indice di un efficace controllo del processo patologico. Sebbene nella BP si riscontri una certa correlazione tra titolo e attività della malattia, il valore prognostico è inferiore a quello della PV a causa delle fluttuazioni del titolo. Gli studi sul siero possono essere diagnostici di PV o BP; tuttavia, è spesso consigliabile eseguire studi immunocitochimici diretti su biopsie di lesioni cutanee (1, 2). Gli studi di immunofluorescenza diretta su biopsie cutanee possono essere facilitati con il fissativo e la soluzione di lavaggio ZEUS Tissue, preparati secondo Michel (5). Questo nuovo fissativo elimina la necessità di congelare immediatamente il campione biptico e consente il trasporto di biopsie fresche di cute e altri tessuti fino a 5 giorni a temperatura ambiente.

PRINCIPIO DEL TEST

L'ASA (Esofago di Scimmia) è stato progettato per rilevare la presenza di anticorpi circolanti contro il pemfigo e il pemfigoide bolloso nei sieri umani. Il test utilizza un substrato di tessuto di esofago di scimmia e anticorpo di capra anti-immunoglobuline umane regolato per una diluizione ottimale e prive di colorazioni di fondo non specifiche. La reazione avviene in due fasi:

1. La prima fase consiste nell'interazione degli anticorpi anti-epidermide presenti nei sieri del paziente con l'esofago della scimmia.
2. La seconda fase consiste nell'interazione dell'immunoglobulina anti-umana marcata con FITC con gli anticorpi attaccati al cemento intercellulare delle cellule epiteliali nel pemfigoide o alla zona della membrana basale nel pemfigoide bolloso in un test positivo (per i dettagli, vedere la sezione Procedura del test).

L'ASA (Esofago di Scimmia) è in grado di rilevare sia gli anticorpi della PV che quelli della BP. Il test è un ausilio di laboratorio particolarmente utile per la diagnosi di PV e BP, poiché la maggior parte dei pazienti non trattati con malattia attiva contiene anticorpi anti-pelle nel siero.

REAGENTI

Materiali forniti:

Ogni kit contiene i seguenti componenti in quantità sufficiente per eseguire il numero di test indicato sull'etichetta della confezione.

NOTA: Il coniugato e i controlli contengono una combinazione di Proclin (0,05% v/v) e Sodio Azide (<0,1% w/v) come conservanti.

S L D	1	Vetrini di substrato di esofago di scimmia: Dieci vetrini da 8 pozzetti con carta assorbente e sacchetto essiccante.
CONJ	2	Coniugato: Anticorpo di capra anti-immunoglobuline umane (polivalente) marcata con isotiocianato di fluoresceina (FITC). Contiene tampone fosfato con BSA e controstampo. Due fiale con tappo ambrato da 3,5 mL. Pronte all'uso.
CTRL + 1	3	PV Controllo positivo (Siero Umano): Produce la colorazione delle cellule epiteliali squamose del substrato. Una fiala da 0,5 ml, con tappo rosso. Pronta all'uso.
CTRL + 2	4	BP Controllo positivo (Siero Umano): Produce la colorazione della membrana basale del substrato. Una fiala da 0,5 ml, con tappo blu. Pronta all'uso.
CTRL -	5	Controllo negativo (siero umano): Non produce alcuna colorazione del substrato. Una fiala da 0,5 ml, con tappo verde. Pronta per l'uso.
BUF PBS		Fosfato-salino tamponato (PBS): pH 7,2 ± 0,2. Svuotare il contenuto di ogni confezione di tampone in un litro di acqua distillata o deionizzata. Mescolare fino a sciogliere completamente tutti i sali. Due bustine, sufficienti per preparare 2 litri.
MNTMED		Mezzo di montaggio (glicerolo tamponato): Una fiala da 3,0 mL con tappo bianco e contagocce.
COVGLS		Coprivetrini. Confezione da dodici, 24 x 60 mm, spessore #1.

NOTE:

- I seguenti componenti non dipendono dal numero di lotto del kit e possono essere utilizzati in modo intercambiabile con i prodotti IFA di Sebia, a condizione che i numeri di prodotto siano identici: Mezzo di montaggio (Codice prodotto: FA0009S) PBS (Codice prodotto: 0008S), e Coprivetrino (Codice prodotto: S8007)

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

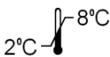
- Microscopio automatico diFine® o un microscopio a fluorescenza adeguatamente attrezzato.
- Pipette sierologiche, Pasteur, capillari o automatiche di piccole dimensioni.
- Puntali per pipette monouso.
- Piccole provette, 13 x 100mm o simili.
- Portaprovette.
- Vasca per colorazione: Una vasca per colorazione con un piccolo sistema di miscelazione magnetica rappresenta un meccanismo ideale per il lavaggio dei vetrini tra le fasi di incubazione.
- Acqua distillata o deionizzata.
- Microscopio a fluorescenza adeguatamente equipaggiato.
- Cilindro graduato da 1 litro.
- Timer da laboratorio per monitorare i tempi di incubazione.
- Bacinella di smaltimento, guanti monouso e disinfettante (es.: candeggina domestica al 10% - 0,5% di ipoclorito di sodio).

I seguenti sistemi di filtri, o i loro equivalenti, sono stati trovati soddisfacenti per l'uso routinario con assemblaggi a campo oscuro a luce trasmessa o incidente:

Luce Trasmessa		
Sorgente di luce: Vapori di mercurio 200W o 50 W		
Filtro di eccitazione	Filtro di eccitazione	Filtro di eccitazione
KP490	KP490	KP490
BG12	BG12	BG12
FITC	FITC	FITC
Sorgente di luce: Tungsteno – Alogeno 100 W		
KP490	KP490	KP490

Luce Incidente			
Sorgente di luce: Vapori di mercurio 200, 100, 50 W			
Filtro di eccitazione	Filtro di eccitazione	Filtro di eccitazione	Filtro di eccitazione
KP500	KP500	KP500	KP500
FITC	FITC	FITC	FITC
Sorgente di luce: Tungsteno – Alogeno 50 e 100 W			
KP500	KP500	KP500	KP500
FITC	FITC	FITC	FITC

INDICAZIONI DI CONSERVAZIONE

	Sistema di test sigillato.
	Mezzo di montaggio, Coniugato, Vetrini, Controlli positivi e negativi.
	PBS reidratato (stabile per 30 giorni).
	Pacchetti di tampone fosfato salino (PBS).

PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico *in vitro*.
2. Seguire le normali precauzioni durante la manipolazione dei reagenti di laboratorio. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico. Indossare abbigliamento protettivo adeguato, guanti e protezione per occhi e viso. Non respirare i vapori. Smaltire i rifiuti seguendo tutte le normative locali, statali e federali.
3. I pozzetti del vetrino non contengono organismi vitali. Tuttavia, considerare il vetrino come **materiali potenzialmente a rischio biologico** e trattarlo di conseguenza.
4. I controlli sono **materiali potenzialmente a rischio biologico**. I materiali di partenza da cui sono stati ricavati questi prodotti sono risultati negativi all'antigene HIV-1, all'HBsAg e agli anticorpi contro HCV e HIV con metodi di analisi approvati. Tuttavia, poiché nessun metodo di analisi può offrire una garanzia completa dell'assenza di agenti infettivi, questi prodotti devono essere manipolati al livello di biosicurezza 2, come raccomandato per qualsiasi siero umano potenzialmente infettivo o campione di sangue nel manuale del Center for Disease Control/National Institutes of Health "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (edizione attuale) e nello Standard OSHA per i patogeni trasmessi per via ematica (20).
5. Il rispetto dei tempi e della temperatura di incubazione indicati è essenziale per ottenere risultati accurati. **Tutti i reagenti devono essere lasciati raggiungere la temperatura ambiente (20 - 25°C) prima di iniziare il test.** Restituire immediatamente i reagenti non utilizzati nei loro contenitori originali e seguire le indicazioni per la conservazione.
6. Un lavaggio improprio potrebbe causare risultati falsi positivi o falsi negativi. Assicurarsi di minimizzare la quantità di PBS residuo, tamponando, prima di aggiungere il coniugato. Non permettere che i pozzetti si asciughino tra le incubazioni.
7. Il coniugato e i controlli contengono Azide di sodio a una concentrazione di <0,1% (p/v). È stato riferito che l'azide di sodio può formare azidi di piombo o rame negli impianti idraulici di laboratorio, il che potrebbe causare esplosioni se colpiti. Per prevenire ciò, sciacquare accuratamente il lavandino con acqua dopo aver smaltito soluzioni contenenti azide di sodio. Questo conservante potrebbe essere tossico se ingerito.
8. La diluizione o adulterazione di questi reagenti potrebbe generare risultati errati.
9. Non pipettare mai con la bocca. Evitare il contatto dei reagenti e dei campioni del paziente con la pelle e le mucose.
10. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti. Risultati errati potrebbero verificarsi.
11. La contaminazione incrociata dei reagenti e/o dei campioni potrebbe causare risultati errati.
12. Il vetro riutilizzabile deve essere lavato e sciacquato accuratamente per rimuovere tutti i detersivi.
13. Evitare schizzi o la formazione di aerosol.
14. Non esporre i reagenti alla luce intensa durante la conservazione o l'incubazione.
15. Lasciare che il pacchetto dei vetrini si equilibri alla temperatura ambiente prima di aprire la busta protettiva per proteggere i pozzetti e la carta assorbente dalla condensazione.
16. Raccogliere la soluzione di lavaggio in un contenitore di smaltimento. Trattare la soluzione di scarto con un disinfettante (ad esempio: candeggina domestica al 10% – 0,5% di Ipoclorito di Sodio). Evitare l'esposizione dei reagenti ai vapori di candeggina.

17. Non esporre nessuno dei reagenti reattivi a soluzioni contenenti candeggina o a forti odori derivanti da soluzioni contenenti candeggina. Piccole tracce di candeggina (Ipoclorito di Sodio) potrebbero distruggere l'attività biologica di molti dei reagenti reattivi in questo sistema di test.
18. Non applicare pressione alla busta dei vetrini. Ciò potrebbe danneggiare il substrato.
19. I componenti di questo sistema di test sono abbinati per ottenere la massima sensibilità e riproducibilità. I reagenti di altri produttori non devono essere scambiati. Seguire attentamente le istruzioni nel foglio illustrativo.
20. I componenti non aperti/aperti sono stabili fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta, a condizione che vengano seguite scrupolosamente le condizioni di conservazione raccomandate. Non utilizzare oltre la data di scadenza. Non congelare.
21. La colorazione di contrasto blu di Evans è un potenziale cancerogeno. Se viene a contatto con la pelle, sciacquare con acqua. Smaltire secondo le normative locali.
22. Non lasciare che i vetrini si asciughino durante la procedura. A seconda delle condizioni di laboratorio, potrebbe essere necessario mettere i vetrini in una camera umida durante le incubazioni.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

1. Eseguire la raccolta del campione in conformità con il documento CLSI M29: Protezione dei lavoratori di laboratorio dalle malattie infettive acquisite per lavoro. Nessun metodo di test conosciuto può garantire completamente che i campioni di sangue umano non trasmettano infezioni. Pertanto, tutti i derivati del sangue devono essere considerati potenzialmente infettivi.
2. Utilizzare solo siero prelevato di recente e correttamente refrigerato ottenuto mediante procedure di venipuntura asettica approvate per questo test (8). Non devono essere aggiunti anticoagulanti o conservanti. Evitare di utilizzare siero emolizzato, lipemico o contaminato battericamente.
3. Conservare il campione a temperatura ambiente per non più di 8 ore. Se il test non viene eseguito entro 8 ore, il siero può essere conservato tra 2 - 8°C, per un massimo di 48 ore. Se si prevede un ritardo nel test, conservare il siero a -20°C o inferiore. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo che possono causare perdita di attività degli anticorpi e dare risultati errati. È responsabilità del laboratorio utilizzare tutti i riferimenti disponibili e/o i propri studi per determinare i criteri di stabilità per il proprio laboratorio (11).

PROCEDURA DEL TEST

1. Rimuovere i vetrini e gli altri componenti del kit dalla conservazione in frigorifero e lasciarli riscaldare a temperatura ambiente (20 - 25°C). Aprire la busta protettiva e rimuovere i vetrini. **Non applicare pressione sui lati piatti della busta protettiva.**
2. Identificare ogni pozzetto con il siero del paziente e i controlli appropriati. **NOTA: I controlli sono destinati ad essere usati non diluiti.** una diluizione 1:20 (ad esempio: 10µL di siero + 190µL di PBS) di ciascun siero del paziente.

Opzioni di diluizione:

- a. Gli utenti possono titolare il controllo Positivo fino all'endpoint per fungere da controllo semiquantitativo (1+ minimamente reattivo). In questi casi, il controllo deve essere diluito due volte in PBS. Una diluizione finale è stabilita e stampata sulla fiala del controllo Positivo (± una diluizione). Si noti che, a causa delle variazioni all'interno del laboratorio (apparecchiature, ecc.), ogni laboratorio deve stabilire il proprio titolo finale previsto per ogni lotto di controllo Positivo.
 - b. Quando si titolano i campioni dei pazienti, la diluizione iniziale e tutte quelle successive devono essere preparate solo in PBS.
3. Lavare i vetrini per 3 - 5 minuti in PBS.
 4. Rimuovere i vetrini dal PBS e asciugare con carta assorbente a sei pozzetti. Si consiglia di posizionare la carta assorbente su una superficie piana. Posizionare quindi il vetrino del substrato in posizione capovolta sulla carta assorbente. Premere con forza sul retro del vetrino. Non lasciare che il substrato di tessuto si asciughi durante la procedura di test.
 5. Con un dispensatore adeguato (elencato sopra), distribuire 20µL di ciascun controllo e di ciascun siero diluito del paziente nei pozzetti appropriati.
 6. Incubare i vetrini a temperatura ambiente (20 - 25°C) per 35 ± 5 minuti.
 7. Risciacquare delicatamente i vetrini con PBS. **Non indirizzare un getto di PBS nei pozzetti di test.**
 8. Lavare i vetrini per due intervalli di 5 minuti, cambiando PBS tra i lavaggi.
 9. Rimuovere i vetrini dal PBS uno alla volta. Invertire il vetrino e collegare i pozzetti ai fori dei tamponi in dotazione. Tamponare il vetrino strofinando il retro con un panno assorbente. **ATTENZIONE:** posizionare il tampone e il vetrino su una superficie dura e piana. La tamponatura su carta assorbente può distruggere la matrice del vetrino. **Non lasciare che i vetrini si asciughino durante la procedura di test.**
 10. Ripetere i passaggi da 6 a 9.
 11. Applicare 3-5 gocce di mezzo di montaggio su ogni vetrino tra i pozzetti e applicare il coprivetrino. In alternativa, si può applicare una piccola quantità di mezzo di montaggio in ogni pozzetto e applicare il coprivetrino. Esaminare immediatamente i vetrini con un microscopio a fluorescenza appropriato.

NOTA: Se si prevede un ritardo nell'esame dei vetrini, sigillare il coprivetrino con uno smalto trasparente e conservare in frigorifero. Si raccomanda di esaminare i vetrini lo stesso giorno del test.

CONTROLLO QUALITÀ

1. Ogni volta che il test viene eseguito, devono essere inclusi un controllo Positivo e un controllo Negativo.

2. Si raccomanda di leggere i controlli positivi e negativi prima di valutare i risultati del test. Questo aiuterà a stabilire i riferimenti necessari per interpretare il campione in esame. Se i controlli non appaiono come descritto di seguito, i risultati sono invalidi.
 - a. Controlli negativi - caratterizzati dall'assenza di colorazione fluorescente delle cellule epiteliali squamose e/o della zona della membrana basale.
 - b. Controlli positivi - Il controllo positivo PV è caratterizzato da qualsiasi colorazione fluorescente verde mela tra le cellule epiteliali squamose. Il controllo positivo BP è caratterizzato da una colorazione specifica della zona della membrana basale.
3. Possono essere testati ulteriori controlli secondo le linee guida o i requisiti delle normative locali, statali e/o federali o delle organizzazioni di accreditamento.

NOTE:

- a. **L'intensità della fluorescenza osservata può variare a seconda del microscopio e del sistema di filtri utilizzato.**
- b. **È possibile che si verifichi un intrappolamento non specifico dei reagenti. È importante lavare adeguatamente i vetrini per eliminare i risultati falsi positivi.**

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. Qualsiasi colorazione verde mela delle strutture specifiche sopra indicate su una scala da 1+ a 4+ è considerata positiva. 1+ è considerato una reazione debole e 4+ una reazione forte. Tutti i sieri positivi a 1:10 devono essere titolati alla diluizione endpoint. A tal fine, si eseguono diluizioni seriali 1:20, 1:40, 1:80, ecc. di tutti i sieri positivi. Il titolo finale è la diluizione più alta che produce una reazione positiva. La colorazione nucleare specifica dei nuclei delle cellule epiteliali è considerata un test positivo per gli anticorpi antinucleari che possono essere associati al LES e ad altre malattie del tessuto connettivo.
2. Titoli inferiori a 1:10 sono considerati negativi.
3. Test positivo:
 - a. La colorazione intercellulare specifica tra le cellule epiteliali squamose è considerata un test positivo per gli anticorpi del pemfigo.
 - b. La colorazione specifica della zona della membrana basale è considerata un test positivo per il pemfigoide bolloso.

LIMITAZIONI DEL TEST

1. L'ASA (Esofago di Scimmia) è un aiuto diagnostico di laboratorio e di per sé non è diagnostico.
2. I risultati devono essere interpretati alla luce delle condizioni cliniche del paziente.
3. Con questo prodotto non si intende stabilire un'associazione definitiva tra il modello di fluorescenza e uno stato patologico specifico.
4. Non esiste uno standard americano di potenza.

REFERENZE

1. Cooperative study. Uses for Immunofluorescence test of skin and sera. Utilization immunofluorescence in the diagnosis of Bullous diseases, Lupus Erythematosus, and certain other dermatoses. Arch. Dermatol. 111:372-381, 1975.
2. Jablonski S, Chorzelski TP, Beutner EH, *et al*: Indications for skin and serum immunofluorescent studies in dermatology. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, *et al* (Eds): Immunopathology of the Skin. Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson, and Ross, pp. 1-24, 1973.
3. Chorzelski TP, Jablonski S, Beutner EH: Clinical significance of pemphigus antibodies in: Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, *et al* (Eds): Immunopathology of the Skin, Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson, and Ross. pp. 25-43, 1973.
4. Lever WF: Pemphigus and Pemphigoid. Springfield, IL, Charles C. Thomas, publisher. pp. 3-226, 1965.
5. Michel B, Milner Y, David K: Preservation of Tissue-Fixed immunoglobulins in skin biopsies of patients with lupus erythematosus and bullous diseases: Preliminary report. J. Invest. Dermatology 59: 449-454, 1973.
6. Anderson P, Hale WL: Immunohistology of human antibodies on monkey esophagus, In: Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, *et al* (Eds): Immunopathology of the Skin. Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson, and Ross: pp. 271-286, 1973.
7. Tan EM, Vaughn JH: antinuclear antibodies: Significance of biochemical specificities, In Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, *et al* (Eds): Immunopathology of the Skin. Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson, and Ross: pp. 367-378, 1973.
8. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture - Second Edition: approved Standard (1984). Pubblicato dal National Committee for Clinical Laboratory Standards.
9. Lennette DA: Collection and preparation of specimens for virological examination. In: Manual of Clinical Microbiology, 4th ed., EH Lennette, A Balows, WJ Hausler, and HJ Shadomy (Eds): American Society for Microbiology, Washington, DC. Ch. 61, pp. 687-693, 1985.
10. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Registro federale 56:64175-64182, 1991.
11. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines - 4th Edition (2010). CLSI Documento GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.

GLOSSARIO DEI SIMBOLI

I seguenti simboli **potrebbero** essere stati utilizzati nell'etichettatura di questo prodotto.

Simbolo	Descrizione	Simbolo	Descrizione
	Produttore	SLD	Vetrino di supporto
IVD	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>	BUF PBS	Tampone fosfato salino PBS
REF	Numero di catalogo	MNTMED	Mezzo di montaggio
	Sufficiente per n. test	CONJ	Coniugato
LOT	Codice lotto	CTRL + 1	Controllo positivo PV
	Da utilizzare entro	CTRL -	Controllo Negativo
	Limitazioni di temperatura di conservazione	CTRL + 2	Controllo positivo BP
RX Only	Da utilizzare solo su prescrizione medica	Made in the USA	Prodotto negli Stati Uniti
	Consultare le istruzioni elettroniche per l'uso		Conservare in posizione verticale
	Tenere lontano dalla luce solare	COVGLS	Coprivetrino
CE	Conformità alla Direttiva 98/79		

ZEUS Scientific.

200 Evans Way Branchburg, New Jersey, 08876
USA

Numero verde (Stati Uniti): 1 800 286-2111, Opzione 2
Internazionale: +1 908 526 3744

Fax: +1 908 526 2058

Sito web: www.zeusscientific.com

Per il servizio clienti negli Stati Uniti, contattare il distributore locale.
Per supporto tecnico negli Stati Uniti, contattare ZEUS Scientific, chiamare gratuitamente o inviare un'email a support@zeusscientific.com.
Per richieste di servizio clienti e supporto tecnico fuori dagli Stati Uniti, si prega di contattare il distributore locale.

©2019 ZEUS Scientific. Tutti i diritti riservati.



EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
Paesi Bassi