

INSTRUCCIONES PARA USO

**ES**

ASA (Esófago de mono)

REF**FA6001****IVD****Rx Only** Σ 80

USO PREVISTO

El kit Anti-Skin Antibody (ASA) está diseñado para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos asociados con el pénfigo y el penfigoide ampolloso mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFA), y su uso es diagnóstico in vitro.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La mayoría de las autoridades coinciden en que se deben realizar estudios de anticuerpos séricos en todos los casos de sospecha de pénfigo vulgar (PV) y penfigoide ampolloso (BP) (1-4). Los anticuerpos específicos se pueden demostrar en prácticamente todos los casos activos, en particular si se realizan pruebas repetidas durante las diferentes etapas de la enfermedad (1). El sustrato más comúnmente recomendado para estos estudios de anticuerpos séricos es el esófago de mono (6). Tanto los anticuerpos específicos de PV como los de BP se pueden detectar en un único ensayo utilizando este sustrato. Los anticuerpos de PV reaccionan con las sustancias intercelulares entre el epitelio escamoso del esófago de mono, y los anticuerpos de BP reaccionan con la membrana basal de la capa de células epiteliales escamosas (1, 4 y 6). La tinción de anticuerpos antinucleares en los núcleos de las células epiteliales escamosas puede producirse si el suero se obtiene de pacientes con lupus sistémico u otros trastornos del tejido conectivo (7). En los casos de pénfigo vegetante, pénfigo foliáceo (incluida la forma brasileña) y pénfigo eritematoso se puede detectar una tinción intercelular distinta (1). Aunque una sola prueba serológica no es suficiente para determinar la dosis de la terapia farmacológica en el PV, una caída del título al doble indica un control eficaz del proceso patológico. Aunque se encuentra cierta correlación entre el título y la actividad de la enfermedad en el BP, el valor pronóstico es menor que en el PV debido a las fluctuaciones del título. Los estudios séricos pueden ser diagnósticos de PV o BP, pero con frecuencia se recomienda realizar estudios inmunohistoquímicos directos en biopsias de lesiones cutáneas (1, 2). Los estudios inmunofluorescentes directos de biopsias cutáneas se pueden realizar con la solución fijadora y de lavado de tejidos ZEUS, preparada según Michel (5). Este nuevo fijador elimina la necesidad de congelar inmediatamente la muestra de biopsia y permite transportar biopsias de piel y otros tejidos frescos hasta 5 días a temperatura ambiente.

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El ASA (Esófago de mono) está diseñado para detectar la presencia de anticuerpos circulantes contra pénfigo y penfigoide ampolloso en sueros humanos. El ensayo emplea sustrato de tejido de esófago de mono e inmunoglobulina antihumana de cabra ajustada para una dilución óptima y libre de tinción de fondo inespecífica. La reacción se produce en dos pasos:

1. El primer paso es la interacción de los anticuerpos anti-piel del suero del paciente con el esófago del mono.
2. El segundo paso es la interacción de la inmunoglobulina anti-humana marcada con FITC con los anticuerpos adheridos al cemento intercelular de las células epiteliales en el pénfigo, o a la zona de la membrana basal en el penfigoide buloso en un ensayo positivo (véase la sección Procedimiento de ensayo para más detalles).

El ASA (Esófago de mono) detectará tanto anticuerpos PV como BP. El ensayo es una ayuda de laboratorio particularmente útil en el diagnóstico de PV y BP, ya que la mayoría de los pacientes no tratados con enfermedad activa contendrán anticuerpos anti-piel en su suero.

REACTIVOS

Materiales proporcionados:

Cada kit contiene los siguientes componentes en cantidades suficientes para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. **NOTA: El conjugado y los controles contienen una combinación de Proclín (0,05% v/v) y azida sódica (<0,1% p/v) como conservantes.**

S L D	1	Portaobjetos de sustrato para Esófago de mono: Diez portaobjetos de 8 pocillos con papel absorbente y bolsa desecante.
CONJ	2	Conjugado: Inmunoglobulina (IgG) antihumana de cabra marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Contiene tampón fosfato con BSA y contratinción. Dos frascos de 3,5 ml con tapón ámbar. Listo para usar.
CTRL + 1	3	PV Control positivo (suero humano): Producirá tinción de las células epiteliales escamosas del sustrato. Un vial de 0,5 ml con tapón rojo. Listo para usar.
CTRL + 2	4	BP Control positivo (suero humano): Producirá tinción de la membrana basal del sustrato. Un vial de 0,5 ml con tapón azul. Listo para usar.
CTRL -	5	Control negativo (suero humano): No producirá tinción de sustrato. Un vial de 0,5 ml con tapón verde. Listo para usar.
BUF PBS		Solución salina tamponada con fosfato (PBS): pH 7,2 ± 0,2. Vaciar el contenido de cada paquete de tampón en un litro de agua destilada o desionizada. Mezclar hasta que todas las sales estén completamente disueltas. Dos paquetes, suficientes para preparar 2 litros.
MNTMED		Medio de montaje (glicerol tamponado): Un vial de 3,0 ml con tapón blanco y punta de gotero.
COVGLS		Protector de vidrio. Paquete de doce, 24 x 60 mm, Espesor #1.

NOTAS:

- Los siguientes componentes no dependen del número de lote del kit y pueden utilizarse indistintamente con los sistemas de pruebas IFA de Sebia, siempre que los números de producto sean idénticos: Medios de montaje (número de producto: FA0009S) PBS (número de producto: 0008S), y Protector de vidrio (número de producto: S8007)

MATERIALES NECESARIOS PERO NO PROPORCIONADOS

- Microscopio automatizado diFine® o un microscopio de fluorescencia debidamente equipado.
 - Pequeñas pipetas serológicas, pasteur, capilares o automáticas.
 - Puntas de pipeta desechables.
 - Tubos de ensayo pequeños, de 13 x 100 mm o similares.
 - Gradillas para tubos de ensayo.
 - Cubeta de tinción: Una gran cubeta de tinción con un pequeño mezclador magnético es el mecanismo ideal para lavar los portaobjetos entre los pasos de incubación.
 - Agua destilada o desionizada.
 - Microscopio de fluorescencia debidamente equipado.
 - Probeta graduada de 1 litro.
 - Temporizador de laboratorio para controlar los pasos de incubación.
 - Cubeta de eliminación, guantes desechables y desinfectante (por ejemplo: lejía doméstica al 10% - Hipoclorito sódico al 0,5%).
- Los siguientes sistemas de filtros, o sus equivalentes, han demostrado ser satisfactorios para el uso rutinario con conjuntos de campo oscuro de luz transmitida o incidente:

Transmisión de la luz		
Fuente de luz: Vapor de mercurio 200W o 50W		
Filtro de excitación	Filtro de excitación	Filtro de excitación
KP490	KP490	KP490
BG12	BG12	BG12
FITC	FITC	FITC
Fuente de luz: Tungsteno - Halógena 100W		
KP490	KP490	KP490

Incidencia de la luz			
Fuente de luz: Vapor de mercurio 200, 100, 50 W			
Filtro de excitación	Filtro de excitación	Filtro de excitación	Filtro de excitación
KP500	KP500	KP500	KP500
FITC	FITC	FITC	FITC
Fuente de luz: Tungsteno - Halógena 100W			
KP500	KP500	KP500	KP500
FITC	FITC	FITC	FITC

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

	Kit sin abrir.
	Medios de montaje, conjugado, portaobjetos, controles positivos y negativos.
	PBS rehidratado (estable durante 30 días).
	Paquetes de solución salina tamponada con fosfato (PBS).

PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Seguir las precauciones normales ejercidas en la manipulación de reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con abundante agua y consultar a un médico. Llevar ropa de protección adecuada, guantes y protección para los ojos/la cara. No respirar los vapores. Eliminar los residuos respetando todas las leyes locales, estatales y federales.
3. Los pocillos del portaobjetos no contienen organismos viables. No obstante, considerar al portaobjetos como material potencialmente biopeligroso y manipularlo en consecuencia.
4. Los controles son materiales **potencialmente biopeligrosos**. Los materiales de origen de los que proceden estos productos dieron negativo para el antígeno VIH-1, el HBsAg y los anticuerpos contra el VHC y el VIH mediante métodos de prueba aprobados. Sin embargo, dado que ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de ausencia de agentes infecciosos, estos productos deben manipularse en el nivel 2 de bioseguridad, tal como se recomienda para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en el manual "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" de los centros de control de enfermedades y los institutos nacionales de salud: edición actual; y la norma de la OSHA sobre patógenos transmitidos por la sangre (20).
5. Es esencial respetar el tiempo y la temperatura de incubación especificados para obtener resultados precisos. **Se debe permitir que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20 - 25°C) antes de iniciar el ensayo.** Devolver inmediatamente los reactivos no utilizados a sus envases originales y seguir los requisitos de almacenamiento.
6. Un lavado inadecuado podría causar resultados falsos positivos o falsos negativos. Asegurarse de minimizar la cantidad de PBS residual, mediante lavado, antes de añadir el conjugado. No dejar que los pocillos se sequen entre incubaciones.
7. El conjugado y los controles contienen azida sódica en una concentración <0,1% (p/v). Se ha notificado que la azida sódica forma azidas de plomo o cobre en las tuberías de los laboratorios, lo que puede causar explosiones al martillar. Para evitarlo, enjuagar bien el fregadero con agua después de eliminar la solución que contenga azida sódica. Este conservante puede ser tóxico si se ingiere.
8. La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
9. No pipetear nunca con la boca. Evitar el contacto de los reactivos y las muestras de los pacientes con la piel y las mucosas.
10. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos. Pueden producirse resultados incorrectos.
11. La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría provocar resultados erróneos.
12. La cristalería reutilizable debe lavarse y aclararse a fondo sin ningún tipo de detergente.
13. Evitar salpicaduras o generación de aerosoles.
14. No exponer los reactivos a una luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
15. Dejar que el paquete de portaobjetos se equilibre a temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector protegerá los pocillos y el papel secante de la condensación.

16. Recoger la solución de lavado en un recipiente para desechos. Tratar la solución residual con desinfectante (por ejemplo: lejía doméstica al 10% - Hipoclorito sódico al 0,5%). Evitar la exposición de los reactivos a los vapores de lejía.
17. No exponer ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía ni a olores fuertes de soluciones que contengan lejía. Trazas de lejía (hipoclorito sódico) pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos de este kit.
18. No ejercer presión sobre el sobre de deslizamiento. Podría dañar el sustrato.
19. Los componentes de este kit están adaptados para una sensibilidad y reproducibilidad óptimas. No deben intercambiarse reactivos de otros fabricantes. Seguir atentamente las instrucciones del envase.
20. Los componentes no abiertos/abiertos son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta, siempre que se sigan estrictamente las condiciones de conservación recomendadas. No utilizar después de la fecha de caducidad. No congelar.
21. La contratinción azul de Evans es un carcinógeno potencial. En caso de contacto con la piel, lavar con agua. Eliminar de acuerdo con la normativa local.
22. No deje que los portaobjetos se sequen durante el procedimiento. Dependiendo de las condiciones del laboratorio, puede que sea necesario colocar los portaobjetos en una cámara húmeda durante las incubaciones.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

1. Realizar la recogida de muestras de acuerdo con el documento M29 del CLSI: Protección de los trabajadores de laboratorio frente a enfermedades infecciosas adquiridas ocupacionalmente. Ningún método de análisis conocido puede ofrecer una garantía completa de que las muestras de sangre humana no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados sanguíneos deben considerarse potencialmente infecciosos.
2. Sólo sueros recién extraídos y debidamente refrigerados obtenidos mediante procedimientos de venopunción aséptica aprobados con este ensayo (8). No deben añadirse anticoagulantes ni conservantes. Evitar el uso de sueros hemolizados, lipémicos o contaminados bacteriamente.
3. Conservar la muestra a temperatura ambiente durante un máximo de 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, los sueros pueden almacenarse entre 2 - 8°C, durante no más de 48 horas. Si se prevé un retraso en la prueba, almacenar los sueros de prueba a -20°C o menos. Evitar múltiples ciclos de congelación/descongelación que pueden causar pérdida de actividad de anticuerpos y arrojar resultados erróneos. Es responsabilidad del laboratorio individual utilizar todas las referencias disponibles y/o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (11).

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1. Retirar los portaobjetos del almacén refrigerado y dejar que se calienten a temperatura ambiente (20 - 25°C). Abrir el sobre protector y retirar los portaobjetos. **No ejercer presión sobre las caras planas del sobre protector.**
2. Identificar cada pocillo con los sueros del paciente y los controles apropiados. **NOTA: Los controles deben utilizarse sin diluir.** Preparar una dilución 1:10 (por ejemplo: 10µL de suero + 90µL de PBS) de cada suero de paciente.

Opciones de dilución:

- a. Los usuarios pueden valorar el control positivo hasta el punto final para que sirva como control semicuantitativo (1+ mínimamente reactivo). En tales casos, el control debe diluirse dos veces en PBS. Se establece una dilución de punto final y se imprime en el vial de control Positivo ($\pm$ una dilución). Debe tenerse en cuenta que debido a variaciones dentro del laboratorio (equipo, etc.), cada laboratorio debe establecer su propio título de punto final esperado para cada lote de control Positivo.
- b. Al valorar muestras de pacientes, la dilución inicial y todas las diluciones posteriores deben prepararse únicamente en PBS.
3. Lavar los portaobjetos durante 3 - 5 minutos en PBS.
4. Retirar los portaobjetos del PBS y secarlos con papel secante de seis pocillos. Se recomienda colocar el papel secante sobre una superficie plana. A continuación, colocar el portaobjetos de sustrato en posición invertida sobre el papel secante. Presionar firmemente la parte posterior del portaobjetos. No dejar que el sustrato de tejido se seque durante todo el procedimiento de ensayo.
5. Con el dispensador adecuado (listado arriba), suministrar 20µL de cada control y de cada suero diluido del paciente en los pocillos apropiados.
6. Incubar los portaobjetos a temperatura ambiente (20 - 25°C) durante 35±5 minutos.
7. Enjuagar suavemente los portaobjetos con PBS. **No dirigir un chorro de PBS a los pocillos de ensayo.**
8. Lavar los portaobjetos durante dos intervalos de 5 minutos, cambiando el PBS entre lavados.
9. Retirar los portaobjetos del PBS de uno en uno. Invertir el portaobjetos y alinear los pocillos con los orificios de los papeles secantes suministrados. Secar el portaobjetos limpiando el reverso con una toallita absorbente. **PRECAUCIÓN:** Colocar el papel secante y el portaobjetos sobre una superficie dura y plana. El secado sobre papel absorbente puede destruir la matriz del portaobjetos. **No dejar que los portaobjetos se sequen durante el procedimiento de ensayo.**
10. Añadir 20-40µL de conjugado a cada pocillo.
11. Repetir las etapas 6 a 9.
12. Aplicar 3-5 gotas de medio de montaje a cada portaobjetos entre los pocillos y aplicar el cubreobjetos. Alternativamente, se puede aplicar una pequeña cantidad de medio de montaje a cada pocillo y aplicar el protector de vidrio. Examinar inmediatamente los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia adecuado.

NOTA: Si se prevé un retraso en el examen de los portaobjetos, sellar el cubreobjetos con esmalte de uñas transparente y guardar en el refrigerador. Se recomienda examinar los portaobjetos el mismo día de la prueba.

CONTROL DE CALIDAD

1. Cada vez que se realice el ensayo, debe incluirse un control positivo y un control negativo.
2. Se recomienda leer los controles positivo y negativo antes de evaluar los resultados de la prueba. Esto ayudará a establecer las referencias necesarias para interpretar la muestra de prueba. Si los controles no aparecen como se describen, los resultados no se considerarán válidos.
 - a. Control negativo: se caracteriza por la ausencia de tinción fluorescente de las células epiteliales escamosas y/o de la zona de la membrana basal.
 - b. Controles positivos – El control positivo PV se caracteriza por cualquier tinción fluorescente verde manzana entre las células epiteliales escamosas. El control positivo BP se caracteriza por la tinción específica de la zona de la membrana basal.
3. Podrán probarse controles adicionales de acuerdo con las directrices o requisitos de las normativas locales, estatales y/o federales o de las organizaciones de acreditación.

NOTAS:

- a. **La intensidad de la fluorescencia observada puede variar con el microscopio y el sistema de filtros utilizados.**
- b. **Puede existir atrapamiento de reactivos no específicos. Es importante lavar adecuadamente los portaobjetos para eliminar los falsos positivos.**

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Se considera positiva toda tinción verde manzana de las estructuras específicas señaladas anteriormente en una escala de 1+ a 4+. Un 1+ se considera una reacción débil, y 4+ una reacción fuerte. Todos los sueros positivos a una dilución de 1:10 deben ser titulados a una dilución de punto final. Esto se logra haciendo diluciones seriadas 1:20, 1:40, 1:80, etc., de todos los positivos. El punto final es la dilución más alta que produce una reacción positiva perceptible. La tinción nuclear específica de los núcleos de las células epiteliales se considera una prueba positiva para los anticuerpos antinucleares que pueden estar asociados con el LES y otras enfermedades del tejido conjuntivo.
2. Los títulos inferiores a 1:10 se consideran negativos.
3. Prueba positiva:
 - a. La tinción intercelular específica entre las células epiteliales escamosas se considera una prueba positiva para los anticuerpos del pénfigo.
 - b. La tinción específica de la zona de la membrana basal se considera una prueba positiva para el pénfigoide buloso.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

1. El ASA (Esófago de Mono) es una ayuda de laboratorio y por sí mismo no es diagnóstico.
2. Los resultados deben interpretarse a la luz del estado clínico del paciente.
3. Con este producto no se pretende establecer ninguna asociación definitiva entre el patrón de fluorescencia y ningún estado patológico específico.
4. No existe un estándar de potencia en EE.UU.

REFERENCIAS

1. Estudio cooperativo. Usos de la prueba de inmunofluorescencia de piel y sueros. Utilización de la inmunofluorescencia en el diagnóstico de enfermedades bullosas, lupus eritematoso y algunas otras dermatosis. Arch. Dermatol. III:372-381, 1975.
2. Jablonski S, Chorzelski TP, Beutner EH, et al: Indicaciones de los estudios de inmunofluorescencia cutánea y sérica en dermatología. En: 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: Importancia clínica de los anticuerpos contra el pénfigo en: 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: Pénfigo y pénfigoide. Springfield, IL, Charles C. Thomas, editor. pp. 3-226, 1965.
5. Michel B, Milner Y, David K: Preservación de inmunoglobulinas fijadas en tejido en biopsias cutáneas de pacientes con lupus eritematoso y enfermedades bullosas: Informe preliminar. J. Invest. Dermatology 59: 449-454, 1973.
6. Anderson P, Hale WL: Inmunohistología de anticuerpos humanos en esófago de mono, In: Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, et al (Eds): Inmunopatología de la piel. Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson, and Ross: pp. 271-286, 1973.
7. Tan EM, Vaughn JH: Anticuerpos antinucleares: Importancia de las especificidades bioquímicas, en Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, et al (Eds): Inmunopatología de la piel. Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson y Ross: pp. 367-378, 1973.
8. Procedimientos para la recolección de muestras de sangre para diagnóstico por venopunción – Segunda Edición: Norma aprobada (1984). Publicado por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico.
9. Lennette DA: Recolección y preparación de muestras para examen virológico. En: Manual de Microbiología Clínica, 4ª ed., EH Lennette, A Balows, WJ Hausler y HJ Shadomy (Eds): Sociedad Americana de Microbiología, Washington, DC. Ch. 61, pp. 687-693, 1985.
10. Departamento de Trabajo de EE.UU., Administración de Seguridad y Salud Ocupacional: Exposición Ocupacional a Patógenos de Transmisión Sanguínea, Regla Final. Registro Fed. 56:64175-64182, 1991.
11. Procedimientos para la manipulación y el procesamiento de muestras de sangre para pruebas de laboratorio comunes; Directrices aprobadas – 4ª edición (2010). Documento GP44-A4 del CLSI (ISBN 1-56238-724-3). Laboratorio Clínico e Instituto de Normas, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

Los siguientes símbolos pueden haber sido utilizados en el etiquetado de este producto.

Símbolo	Descripción	Símbolo	Descripción
	Fabricante	S L D	Portaobjetos de sustrato
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	BUF PBS	Tampón PBS
REF	Número de catálogo	MNTMED	Medios de montaje
	Suficiente para <i>n</i> pruebas	CONJ	Conjugado
LOT	Código de lote	CTRL + 1	Control Positivo PV
	Usar antes de	CTRL -	Control Negativo
	Limitaciones de temperatura de almacenamiento	CTRL + 2	Control Positivo BP
RX Only	Solo con receta médica	Made in the USA	Fabricado en EE.UU.
	Consulte las instrucciones electrónicas de uso		Guardar en posición vertical
	Mantener alejado de la luz solar	COVGLS	Tapa de cristal
CE	Conformidad con la Directiva 98/79		



ZEUS Scientific

200 Evans Way, Branchburg, Nueva Jersey, 08876, EE. UU.

Llamada gratuita (EE. UU.): 1-800-286-2111, opción 2

Internacional: +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Página web: www.zeusscientific.com

Para el servicio de atención al cliente en EE. UU., póngase en contacto con su distribuidor local.

Para el servicio de asistencia técnica en EE. UU., póngase en contacto con ZEUS Scientific, llamando al número gratuito o enviando un correo electrónico a support@zeusscientific.com.

Para consultas sobre el servicio de atención al cliente y asistencia técnica fuera de EE. UU., póngase en contacto con su distribuidor local.

©2019 ZEUS Scientific. Todos los derechos reservados.



EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands