

ICA IFA

REF 85848

Saggio di immunofluorescenza indiretta per la determinazione degli anticorpi IgG nel siero umano contro gli antigeni dell'insula pancreatica (ICA)



GA Generic Assays GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow OT Dahlewitz
Germania

Telefono: +49 33708 9286 0
Fax: +49 33708 4417 25

info@genericassays.com
www.genericassays.com



12 x 4



1 Destinazione d'uso

L'ICA IFA è un saggio di immunofluorescenza (IFI) per la determinazione qualitativa e semiquantitativa degli anticorpi IgG nel siero umano contro gli antigeni delle insula pancreatica (ICA) su sezioni di tessuto del pancreas di scimmia.

L'ICA IFA è un ausilio per la diagnosi del diabete mellito autoimmune di tipo I in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

L'immunodosaggio è progettato per l'uso professionale manuale nella diagnostica *in vitro*.

2 Rilevanza diagnostica

Il diabete di tipo 1, noto anche come diabete mellito insulino-dipendente (DMID), è caratterizzato dalla cronica distruzione autoimmune delle β -cellule pancreatiche secernenti insulina. La simultanea azione di specifici linfociti T CD4+ e CD8+ auto-reattivi contribuisce a questa distruzione. Già prima dell'insorgenza del diabete di tipo 1 vari anticorpi diretti contro antigeni dell'insula pancreatica possono essere rivelati nel siero dei pazienti. Questo processo può richiedere anni per essere completato e può verificarsi in qualsiasi momento a tutte le età. Tali anticorpi rappresentano i marcatori più importanti nell'identificazione di persone con elevato rischio di sviluppare il diabete in un periodo in cui i saggi metabolici disponibili mostrano ancora risultati nella norma.

Gli anticorpi anti-insula pancreatica (ICA) sono stati il primo marcatore sierologico per il diabete mellito di tipo 1. Tali anticorpi facenti parte dell'isotipo IgG sono diretti contro vari antigeni dell'insula pancreatica e sono rilevati mediante immunofluorescenza usando sezioni di pancreas di scimmia.

3 Principio del saggio

L'IFI (immunofluorescenza indiretta) è un immunodosaggio per la determinazione di anticorpi specifici. Sezioni di tessuto o cellule contenenti l'antigene d'interesse immobilizzate su vetrino portaoggetto. Se nel campione del paziente sono presenti anticorpi specifici, questi si legano all'antigene nel tessuto o cellula. Un anticorpo secondario coniugato con isotiocianato di fluoresceina (FITC) rileva l'immunocomplesso generato. I vetrini vengono esaminati con un microscopio a fluorescenza. Una colorazione fluorescente specifica dimostra la presenza di anticorpi specifici nel campione del paziente.

4 Componenti del saggio

Componente	Descrizione
Vetrino per substrato A Ag 4 12 pezzi	12 vetrini (pronti all'uso), 4 pozzetti per vetrino, ogni pozzetto rivestito con sezioni criostatizzate di tessuto di pancreas di scimmia
Controllo negativo N CONTROL - 1 x 2,0 mL	Diluizione di siero umano (pronto all'uso; contiene azoturo di sodio)
Controllo positivo P CONTROL + 1 x 2,0 mL	Diluizione di siero umano (pronto all'uso; contiene azoturo di sodio)
Tampone PBS C BUF PBS 2 x 10 g	Tampone PBS (sostanza secca per 2 x 1000 mL)
Coniugato IgG D CONJ 1 x 5 mL	Anticorpo policlonale anti-IgG umane coniugato con FITC (pronto all'uso; contiene azoturo di sodio)
Soluzione di montaggio E MOUNT 1 x 3,0 mL	Soluzione tamponata in PBS con glicerolo e reagente stabilizzante (pronta all'uso; contiene azoturo di sodio)
Membrana assorbente F TEMPL 12 pezzi	Membrane assorbenti
Coprioggetto G COVER 12 pezzi	Coprioggetto
Certificato CQ 1 pezzo	-
Istruzioni per l'uso 1 pezzo	-

5 Materiale necessario ma non fornito

- Comuni apparecchiature di laboratorio
- Pipette di precisione (5 - 1000 μ L) e puntali monouso
- Cilindri graduati (100 - 1000 mL)
- Provette per la preparazione di diluizioni e portaprovette
- Miscelatore a vortice o altri rotatori
- Camera umida
- Bottiglia di plastica a spruzzo per il lavaggio
- Vaschette Coplin o piatti di colorazione portavetrini
- Microscopio a fluorescenza con una lunghezza d'onda d'eccitazione di 490 nm e una lunghezza d'onda d'emissione rilevabile di 520 nm.
- Carta assorbente
- Acqua distillata o deionizzata

6 Conservazione e stabilità

Una volta ricevuti, tutti i componenti del saggio devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C, preferibilmente nella confezione originale del kit. Se conservati correttamente nei loro contenitori originali, tutti i componenti sono stabili fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura, tutti i componenti del kit sono stabili per almeno 2 mesi, se conservati correttamente.

7 Informazioni generali

Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro*. Le istruzioni per l'uso devono essere lette attentamente prima dell'uso. Esse sono valide solo per il presente prodotto con la composizione indicata e devono essere seguite rigorosamente per garantirne risultati affidabili. Eventuali deviazioni possono portare a risultati errati. I componenti non devono essere scambiati con reagenti di lotti diversi o di altri produttori.

La contaminazione dei reagenti deve essere evitata utilizzando tecniche asettiche durante il prelievo dai contenitori. Dopo l'uso, le fiale di reagente devono essere chiuse ermeticamente con i rispettivi tappi.

La contaminazione incrociata di campioni o reagenti può portare a risultati incoerenti e deve essere evitata utilizzando tecniche di pipettaggio coerenti.

L'esposizione dei reagenti alla luce forte deve essere evitata per tutta la durata della procedura di analisi e della conservazione.

Un lavaggio insufficiente comporta una scarsa precisione e segnali di misura elevati. Dopo ogni fase di lavaggio, il liquido residuo deve essere completamente rimosso.

8 Preparazione

8.1 Preparazione dei reagenti

Tutti i componenti, compresi i vetrini, devono essere portati a temperatura ambiente (TA: da 18 °C a 25 °C) prima dell'uso per almeno 30 minuti. Tutti i componenti liquidi devono essere miscelati delicatamente per garantirne l'omogeneità.

8.1.1 Vetrino

I vetrini sono sigillati singolarmente con un essiccante in buste di alluminio. Rimuovere con cura i vetrini dalle buste direttamente prima dell'uso.

8.1.2 Controlli

I controlli positivi e negativi sono pronti all'uso e non devono essere ulteriormente diluiti. I controlli devono essere utilizzati in ogni analisi. I laboratori possono anche convalidare i propri campioni di controllo e utilizzarli in alternativa.

8.1.3 Tampone PBS

Una miscela di tampone PBS deve essere sciolta in 1,0 L di acqua distillata agitando o scuotendo prima dell'uso. La soluzione di lavaggio risultante deve avere un pH di $7,4 \pm 0,2$ ed è stabile per quattro settimane se conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C. Non utilizzare se il pH cambia, se la soluzione diventa torbida o se si formano precipitati.

8.1.4 Coniugato

Il coniugato è pronto all'uso. Evitare l'esposizione alla luce forte.

8.1.5 Soluzione di montaggio

Il Soluzione di montaggio è pronto all'uso.

8.2 Preparazione dei campioni

8.2.1 Materiale campione

Si raccomanda l'uso di siero appena raccolto da sangue prelevato mediante venipuntura. Si deve evitare l'uso di campioni itterici, lipemici, emolitici o contaminati da batteri. Le sostanze insolubili devono essere rimosse dal campione mediante centrifugazione. I campioni non devono essere inattivati termicamente.

8.2.2 Diluizione del campione

I campioni devono essere diluiti 1:4 (ad es. 50 µL + 150 µL) con tampone PBS e miscelati accuratamente. Si deve evitare la formazione di schiuma.

Per la titolazione dei campioni, si raccomanda la preparazione di una diluizione seriale di 4 volte basata sulla diluizione iniziale 1:4 con tampone PBS, ad esempio 100 µL di diluizione del campione + 300 µL di tampone PBS, ottenendo le diluizioni 1:16; 1:64; 1:256 ecc.

8.2.3 Conservazione dei campioni

I campioni possono essere conservati a 2 °C - 8 °C fino a tre giorni. La conservazione a lungo termine richiede -20 °C. È necessario evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti. Per un uso multiplo, i campioni devono essere aliquotati e conservati a -20 °C.

9 Prestazioni del saggio

9.1 Procedura

È necessario preparare un numero sufficiente di vetrini. Non toccare i pozzetti e non lasciare asciugare i vetrini del substrato durante l'intera procedura del saggio. È necessario rispettare i tempi e le temperature di incubazione indicati ed evitare significativi sbalzi di tempo durante il pipettaggio dei campioni e dei reagenti.

Fase	Descrizione
1. Aggiunta di controlli e campioni diluiti	Aggiungere 50 µL (2 - 3 gocce) di controlli pronti all'uso e 50 µL di campioni diluiti per pozzetto. Assicurarsi che ogni pozzetto sia completamente coperto.
2. Incubazione	Incubare per 30 min a temperatura ambiente in una camera umida.
3. Ciclo di lavaggio	Aspirare il liquido da ciascun pozzetto o risciacquare delicatamente con la soluzione di lavaggio PBS utilizzando un flacone di lavaggio a pressione. Non concentrare il flusso di PBS direttamente sui pozzetti. Per evitare contaminazioni incrociate, evitare di risciacquare da un pozzetto ad altri pozzetti. Per i vetrini a più file, far scorrere il flusso di PBS dalla linea mediana del vetrino, successivamente lungo entrambe le file fino al bordo. Lavare 2 volte per 5 min, cambiando soluzione di PBS nelle vaschette di colorazione Coplin, agitare delicatamente dopo l'introduzione e prima della rimozione dei vetrini. Rimuovere i vetrini dai vasi Coplin e asciugare con cura il vetrino battendo il bordo del vetrino su un asciugamano assorbente, asciugare con cura il vetrino intorno ai pozzetti usando una membrana assorbente per rimuovere le gocce residue.
4. Aggiunta del coniugato	Aggiungere 50 µL (2 - 3 gocce) di coniugato pronto all'uso in ciascun pozzetto. Assicurarsi che ogni pozzetto sia completamente coperto.
5. Incubazione	Incubare per 30 min a TA in camera umida al riparo dalla luce diretta.
6. Ciclo di lavaggio	Ripetere l'intero ciclo di lavaggio del passo 3.
7. Aggiunta di Soluzione di montaggio	Applicare 1 goccia per pozzetto di Soluzione di montaggio pronto all'uso.

8. Copertura	Posizionare con cura un coprioggetto sul vetrino, lasciando che il Soluzione di montaggio formi uno strato uniforme tra il vetrino e il coprioggetto. Evitare la formazione di bolle d'aria. Eliminare l'eccesso di Soluzione di montaggio dai bordi e dal fondo del vetrino con carta assorbente.
9. Analisi	Analizzare il vetrino con un microscopio a fluorescenza con lunghezze d'onda di eccitazione di 490 nm e di emissione di 520 nm entro 24 ore. Evitare esposizioni prolungate di un campo visivo per ridurre al minimo lo sbiancamento della fluorescenza FITC.

9.2 Automazione

L'elaborazione automatizzata dell'immunodosaggio deve essere eseguita in modo analogo all'uso manuale e convalidata dall'utente.

10 Valutazione del saggio

10.1 Tracciabilità metrologica

L'immunodosaggio viene calibrato utilizzando campioni interni come riferimenti.

10.2 Valutazione

La valutazione viene effettuata in base al modello e all'intensità della fluorescenza. L'intensità della fluorescenza può essere semi-quantificata seguendo le linee guida stabilite dal CDC, Atlanta, USA:

4+ = fluorescenza massima, giallo-verde brillante

3+ = fluorescenza giallo-verde meno brillante

2+ = fluorescenza giallo-verde definita ma spenta

1+ = fluorescenza molto debole e tenue

Il grado di intensità non ha rilevanza clinica e ha un valore limitato come indicatore del titolo. Differenze nell'ottica del microscopio, nei filtri e nella sorgente luminosa possono determinare differenze di intensità.

Una diluizione di siero è considerata negativa per le ICA se il tessuto non presenta il modello di fluorescenza specifico delle cellule delle isole pancreatiche (isole di Langerhans).

Una diluizione di siero è considerata positiva per gli anticorpi anti-cellule delle isole pancreatiche se le cellule delle isole pancreatiche (isole di Langerhans) mostrano una colorazione citoplasmatica fluorescente di intensità pari o superiore a 1+.

Se si esegue una valutazione semi-quantitativa mediante titolazione, il risultato deve essere riportato come il reciproco dell'ultima diluizione in cui viene rilevata un'intensità di fluorescenza verde mela 1+ con un modello di colorazione chiaramente distinguibile. Utilizzando la diluizione seriale quadrupla raccomandata, è possibile estrapolare il titolo del punto finale:

1:4=3+

1:16=2+

1:64=+/-

1:256=Il titolo estrapolato è 32.

10.3 Criteri di validità

I saggi sono validi solo se sono soddisfatti i seguenti criteri di validità:

- Il controllo negativo deve essere valutato negativo con un'intensità di fluorescenza < 1+.
- Il controllo positivo deve essere valutato positivo con una fluorescenza citoplasmatica delle isole con un'intensità di fluorescenza da 3+ a 4+.

Se questi criteri non sono soddisfatti, il saggio non è valido e deve essere ripetuto.

10.4 Risoluzione dei problemi

In caso di saggi non validi, occorre verificare le date di scadenza e le condizioni di conservazione, i tempi e le temperature di incubazione e l'esatta calibrazione di tutti gli strumenti utilizzati. Se non è stato possibile identificare una ragione per l'invalidità del saggio, contattare il fornitore o il produttore del prodotto. Una guida alla risoluzione dei problemi è disponibile su richiesta.

10.5 Intervalli di riferimento

Gli intervalli di riferimento sono indicati di seguito:

	Interpretazione
Titolo anticorpale < 1:4	negativo
Titolo dell'anticorpo ≥ 1:4	positivo

A causa delle diverse sieroprevalenze nelle singole regioni, ogni laboratorio deve verificare gli intervalli di riferimento con analisi proprie e adattarli, se necessario.

10.6 Interpretazione dei risultati dei saggi

Un risultato positivo del saggio indica la presenza di anticorpi specifici. Un risultato negativo indica l'assenza di anticorpi specifici, ma non esclude la possibilità di una reazione autoimmune. In caso di risultati incerti, non è possibile effettuare una valutazione affidabile.

Anticorpi contro altre parti della sezione di tessuto potrebbero determinare un rispettivo modello di fluorescenza (ad esempio, nuclei cellulari, mitocondri). Questi motivi devono essere giudicati negativi in relazione alle ICA, ma possono indicare altre malattie autoimmuni e devono essere confermati utilizzando rispettivamente il tessuto di riferimento.

10.7 Limiti del metodo

La determinazione del titolo finale può variare a seconda del tipo e delle condizioni del microscopio a fluorescenza utilizzato e a seconda del giudizio soggettivo dei diversi osservatori.

Campioni e soluzioni di lavaggio contaminati da batteri o funghi potrebbero causare una colorazione aspecifica del substrato di coltura cellulare.

Gli enzimi proteolitici presenti nei campioni dei pazienti potrebbero danneggiare o perdere le sezioni di tessuto fissate sul vetrino.

L'interpretazione dei risultati dei saggi deve sempre essere considerata in combinazione con il quadro clinico del paziente. La diagnosi non deve basarsi sui risultati di un solo metodo diagnostico. Tutti i risultati clinici e di laboratorio devono essere valutati per formulare una diagnosi. Per la conferma, è necessario eseguire ulteriori indagini.

11 Caratteristiche delle prestazioni

11.1 Caratteristiche delle prestazioni analitiche

11.1.1 Sensibilità e specificità analitica

Non è stata osservata alcuna reattività crociata di anticorpi contro antigeni simili.

11.1.2 Precisione

La precisione dei risultati del saggio è stata valutata mediante la determinazione della variazione intra- e inter-saggio attraverso l'analisi di più campioni con diverse attività anticorpali. Non sono state rilevate differenze nella valutazione qualitativa.

11.2 Caratteristiche delle prestazioni diagnostiche

11.2.1 Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità sono state valutate attraverso l'analisi di campioni provenienti da pazienti con diabete autoimmune e da donatori di sangue non selezionati.

	Prestazioni diagnostiche
Sensibilità	> 90 %
Specificità	> 99 %

12 Avvertenze e precauzioni

Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro* da parte di personale qualificato, autorizzato e addestrato. Tutti i componenti del saggio e i campioni umani devono essere maneggiati con cura in quanto potenzialmente pericolosi. È necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio (BPL) e a tutte le normative pertinenti.

Nel caso in cui il prodotto sia danneggiato o le informazioni sul prodotto, compresa l'etichettatura, siano errate o non corrette, si prega di contattare il produttore o il fornitore.

Questo prodotto contiene preparati di origine umana e/o animale. Qualsiasi materiale derivato da fluidi corporei umani o da organi utilizzati per la preparazione dei componenti è stato testato ed è risultato negativo all'HBsAg (Antigene di superficie del virus dell'epatite B) e agli anticorpi anti-HIV e anti-HCV. Tuttavia, tutti i componenti e tutti i campioni dei pazienti devono essere trattati come potenzialmente pericolosi in conformità alle leggi nazionali e alle linee guida appropriate sulla sicurezza biologica.

Poiché il prodotto contiene materiali potenzialmente pericolosi, è necessario seguire le seguenti precauzioni: Non fumare, mangiare o bere durante la manipolazione del materiale del kit o dei campioni. Evitare il contatto diretto con il materiale del kit o con i campioni indossando guanti protettivi, camice da laboratorio e occhiali di sicurezza. Non pipettare mai il materiale per bocca. Pulire prontamente le fuoriuscite e lavare accuratamente la superficie interessata con un decontaminante. Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.

Alcuni reagenti contengono azoturo di sodio (< 0,1%) come conservante e non devono essere ingeriti o lasciati entrare in contatto con la pelle o le mucose. La possibile formazione di azoturi di metalli pesanti negli scarichi deve essere evitata mediante un sufficiente risciacquo con acqua.

È necessario osservare le informazioni contenute nella scheda di sicurezza relative ai possibili pericoli, alle misure di primo soccorso, alle misure da adottare in caso di rilascio involontario di grandi quantità, alla manipolazione e allo stoccaggio, ai dispositivi di protezione individuale, alle informazioni sullo smaltimento e alle informazioni sulla tossicologia.

Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utilizzatore e/o il paziente.

13 Smaltimento

Per la decontaminazione e lo smaltimento è necessario attenersi alle raccomandazioni del CDC e alle linee guida e normative ambientali locali e nazionali pertinenti. I campioni, i materiali potenzialmente contaminati e i rifiuti infettivi devono essere decontaminati, ad esempio mediante autoclavaggio per 20 minuti a 121 °C.

14 Riferimenti

- Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D: Islet cell antibodies in diabetes mellitus with polyendocrine deficiencies; Lancet II 1974; 1273 – 83.
- Soeldner JS, Tuttleman M, Skrikanta S, Ganda OP, Eisenbarth GS: Insulin-dependent diabetes and initiation of autoimmunity: Islet cell autoantibodies, insulin autoantibodies and beta cell function; New Engl. J. Med. 1985, 313, 839 – 900.
- 3. Boitard C, Bonifacio E, Bottazzo GF, Gleichmann H, Molenaar J: Immunology and diabetes workshop: Report on the third

international (stage 3) workshop on standardization of cytoplasmic islet cellantibodies; Diabetologia 1988, 31, 451 – 452.

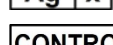
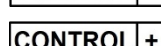
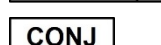
- Batstra MR, Aanstoot HJ, Herbring P: Prediction and diagnosis of Type 1 Diabetes using β -cell autoantibodies; Clin. Lab. 2001; 9+10, 497 – 507.

- Greenbaum J, Palmer JP, Nagataki S: Improved specificity of ICA assays in the 4th international immunology of diabetes serum exchange workshop. Diabetes 1992, 41, 1570 – 4.

- Winter WE, Harris N, Schatz D: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1 Diabetes; Clin Diabetes 2002, 20, 183 – 91.

- Lyerla HC, Forrester FT: The Immunofluorescence (IF) test. In: Immunofluorescence methods in virology, USDHHS, Georgia, 1979, 71 – 81.

15 Simboli

	Produttore
	Marchio di conformità CE
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	Numero di catalogo
	Identificatore univoco del dispositivo
	Codice lotto
	Limite di temperatura
	Data di scadenza
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Contiene un numero sufficiente di <n> saggi
	Non riutilizzare
	Attenzione
	Rischio biologico
	Tenere lontano dalla luce del sole
	Vetrino con x pozzetti
	Controllo negativo
	Controllo positivo
	Coniugato
	Tampone PBS
	Soluzione di montaggio
	Membrana assorbente
	Coprioggetto

16 Modifiche

Modifiche alle attuali istruzioni per l'uso	
Versione attuale	008/09.2022
Sintesi delle modifiche	Modifiche editoriali e adattamento del tampone PBS alla stabilità d'uso.