



REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
“SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO”
CASERTA

Deliberazione del Direttore Generale N. 298 del 13/04/2021

Proponente: Il Direttore UOC PROVVEDITORATO ED ECONOMATO

**Oggetto: FORNITURA DI PRODOTTI UOC PATOLOGIA CLINICA EX DEL. N.185/2019 - “LOTTO N.3
“PROFILI DIAGNOSTICI IMMUNOBLOT” - PROVVEDIMENTI**

PUBBLICAZIONE

In pubblicazione dal 13/04/2021 e per il periodo prescritto dalla vigente normativa in materia (art.8 D.Lgs 14/2013, n.33 e smi)

ESECUTIVITA'

Atto immediatamente esecutivo

TRASMISSIONE

La trasmissione di copia della presente Deliberazione è effettuata al Collegio Sindacale e ai destinatari indicati nell'atto nelle modalità previste dalla normativa vigente. L'inoltro alle UU. OO. aziendali avverrà in forma digitale ai sensi degli artt. 22 e 45 D.gs. n° 82/2005 e s.m.i. e secondo il regolamento aziendale in materia.

UOC AFFARI GENERALI

Direttore Eduardo Chianese

ELENCO FIRMATARI

Gaetano Gubitosa - DIREZIONE GENERALE

Antonietta Costantini - UOC PROVVEDITORATO ED ECONOMATO

Eduardo Scarfiglieri - UOC GESTIONE ECONOMICO FINANZIARIA

Angela Annecchiarico - DIREZIONE SANITARIA

Amalia Carrara - DIREZIONE AMMINISTRATIVA

Eduardo Chianese - UOC AFFARI GENERALI

Oggetto: FORNITURA DI PRODOTTI UOC PATOLOGIA CLINICA EX DEL. N.185/2019 - "LOTTO N.3 "PROFILI DIAGNOSTICI IMMUNOBLOT" - PROVVEDIMENTI

Direttore UOC PROVVEDITORATO ED ECONOMATO

A conclusione di specifica istruttoria, descritta nella narrazione che segue, si rappresenta che ricorrono i presupposti finalizzati all'adozione del presente provvedimento, ai sensi dell'art. 2 della Legge n. 241/1990 e s.m.i.

PREMESSO CHE

- quest'Azienda con deliberazione n.185/2019 (agli atti), previo espletamento di una procedura aperta per l'affidamento triennale della fornitura in noleggio di Sistemi Analitici completi (Lotti n.32) destinati alla UOC di Patologia Clinica è stata disposta l'aggiudicazione ex art. 95, comma 2, del D.Lgs. n.50/2016 e s.m.i. del Lotto n.3, concernente "PROFILI DIAGNOSTICI IMMUNOBLOT" in favore della Ditta EUROIMMUN ITALIA Srl., per l'importo complessivo triennale di € 51.114,83 inclusa Iva al 22%;

- il Direttore della UOC Patologia Clinica, Dott. Arnolfo Petruzzello, al fine di implementare l'offerta diagnostica, ha segnalato *"la necessità di espandere il settore di Autoimmunità"*, richiedendo (nota Prot. gen. n.4873 del 10/02/2021 - allegato n.1) alla UOC Provveditorato - Economato l'approvvigionamento presso la succitata Ditta (contratto n. 4600029486 – CIG n.7498310927) dei test sottoelencati, secondo il fabbisogno annuo da lui indicato (allegato n.1):

- a) Anticorpi anti proteina trombospondina di tipo 1 7 A (THSD7A);
- b) Anticorpi anti recettore fosfolipasi A2 (PLA2PR) determinazione quantitativa;
- c) Anticorpi anti ZnT8;
- d) Anticorpi anti GAD;
- e) Anticorpi anti tirosina fosfatasi (IA-2);
- f) Anticorpi anti insulina;
- g) Anticorpi anti glicoproteina mielinica oligodendrocitaria (MOG);
- h) Anticorpi anti recettore dell'acetilcolina;

- il Direttore Sanitario Aziendale ha autorizzato l'acquisto in parola, come emerge da sua glossa apposta sull'allegata richiesta (allegato n.1);

RILEVATO CHE

- la UOC Provveditorato – Economato ha interpellato (Prot. gen. n.5363 del 16/02/2021 - allegato n.2) la Ditta EUROIMMUN ITALIA Srl., perché producesse offerta per i prodotti di che trattasi;

- in data 24/02/2021 è stata trasmessa al Direttore della UOC Patologia Clinica l'offerta presentata dalla suindicata Società (Prot. FV/MB/123 /2021 - allegato n.3) per la prescritta verifica di conformità (allegato n.4);

- il precitato Direttore ha espresso parere favorevole, chiedendo di procedere all'acquisto, come da annotazione a margine della documentazione di interesse (allegato n.5);

Deliberazione del Direttore Generale

- dalla disamina dell'offerta di che trattasi è emersa la mancata coincidenza tra il quantitativo aziendale dei test in parola e quello in essa riportato, sicché è stato chiesto (mail del 29/03/2021 - allegato n.6) alla EUROIMMUN ITALIA Srl. di *"allineare l'offerta già formulata ai nostri fabbisogni"*;
- la suddetta Società ha rimodulato la propria offerta, precisando (30/03/2021 – allegato n.7) che i kit identificati con codice EA ed EIA sono *"di confezionamento unico da 96 test, non frazionabili"* e l'effettuazione dei test *"richiesti dal laboratoriorichiede l'utilizzo di altri pozzetti, necessari per la calibrazione e i controlli interni"*;
- quest'ultima circostanza è stata confermata per le vie brevi dal Direttore della UOC Patologia Clinica, all'uopo sentito dalla UOC Provveditorato;

CONSIDERATO CHE

- i test di che trattasi permettono di espandere il settore di Autoimmunità nell'ambito della offerta diagnostica della UOC Patologia Clinica, come dichiarato dal Dott. Petruzzello nell'allegata nota (allegato n.1);
- la fornitura in questione è correlata a quella inclusa nel lotto n.3, aggiudicato ex Del. n.185/2019 alla Ditta EUROIMMUN ITALIA Srl per il periodo 2019 – 2022 (aprile 2022), e pertanto occorre allinearne la durata a quella principale;

VISTI l'art.63, comma3, lett. b) e l'art. 95, comma 4, del D.Lgs. n.50/2016 e smi.;

ESAMINATI tutti gli atti innanzi richiamati ed allegati alla presente

RITENUTO

- di disporre l'affidamento annuale della fornitura dei test sottoelencati in favore della Ditta EUROIMMUN ITALIA Srl., aggiudicataria ex deliberazione n.185/2019 del Lotto n.3, per l'importo complessivo scontato di € 7.704,90 oltre Iva al 22%, secondo la configurazione descritta in offerta;
- di dare atto che il costo derivante dal presente provvedimento è pari ad € 9.399, 98 Iva inclusa al 22% ed è da imputarsi sul conto economico 5010105010 "Dispositivi medico-diagnostici in vitro"
- bilancio 2021;

ATTESTATA la legittimità della presente proposta di deliberazione, che è conforme alla vigente normativa in materia;

PROPONE

Per tutto quanto in premessa che qui si intende riportato ed approvato:

I - DI DISPORRE l'affidamento annuale della fornitura dei test sottoelencati, necessari al Settore di Autoimmunità afferente alla UOC Patologia Clinica al fine di espandere l'offerta diagnostica, in favore della Ditta EUROIMMUN ITALIA Srl., aggiudicataria ex deliberazione n.185/2019 del Lotto n.3, per l'importo complessivo scontato di € 7.704,90 oltre Iva al 22%, come di seguito riportato:

Deliberazione del Direttore Generale

Codice prodotto	Descrizione	N. Conf. offerte	Prezzo listino x conf.	Prezzo netto x conf. con applicazione e di scontistica	Prezzo netto x test	Importo Totale Esclusa Iva
EA 1254 - 1005 - 51	Anti THSD7A	2 (50 test cadauna)	1.440,00	1.368,00	27,36000	2.736,00
EA -1254 - 9601 G	Recettore Fosfolipasi A2	1 (96 test cadauna)	1.150,00	1.092,50	11,38021	1.092,50
EA -1027 - 9601	Anti ZnT8	1 (96 test cadauna)	1.300,00	910,00	9,47917	910,00
EA -1022 - 9601 G	GAD	1 (96 test cadauna)	840,00	588,00	6,12500	588,00
EA -1023 9601 G	IA – 2	1 (96 test cadauna)	840,00	588,00	6,12500	588,00
EA -3608	INSULIN Ab	1 (96 test cadauna)	165,00	165,00	1,7185	165,00
FA 1156 -1003 -50	EA3808	2 (30 test cadauna)	546,00	518,70	17,29000	1.037,40
EA 1435 - 9601 G	Anti – Acetylcholinreceptor Elisa ELISA	1 (96 test cadauna)	840,00	588,00	6,12500	588,00

II - DI DARE ATTO che il costo derivante dal presente provvedimento, pari ad € 9.399,98 Iva al 22% , è da imputarsi sul conto economico 5010105010 “Dispositivi medico - diagnostici in vitro” bilancio 2021, come di seguito indicato:

- a) € 7.049,98 pari a 9/12sul bilancio 2021;
- b) € 2.349,99 pari a 3/12 sul bilancio 2022;

III - DI NOTIFICARE il presente provvedimento alla succitata Ditta;

Deliberazione del Direttore Generale

Il presente atto, in formato digitale e firmato elettronicamente, costituisce informazione primaria ed originale ai sensi dei combinati disposti degli artt. 23-ter, 24 e 40 del D.Lgs. n. 82/2005. Eventuale riproduzione analogica, costituisce valore di copia semplice a scopo illustrativo.



REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
"SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO"
CASERTA

IV - DI DESIGNARE Direttore dell'esecuzione del contratto la Dott.ssa Anna Dello Stritto, Direttore della Farmacia Ospedaliera;

V- DI TRASMETTERE copia del presente atto al Collegio Sindacale, ai sensi di legge, alle UU.OO.CC. Gestione Economico Finanziaria, Farmacia Ospedaliera e Patologia Clinica, per quanto di competenza.

IL DIRIGENTE AMMINISTRATIVO

Dott.ssa Teresa Capobianco

IL DIRETTORE U.O.C.

PROVVEDITO RATO – ECONOMATO

Dott.ssa Antonietta Costantini

IL DIRETTORE GENERALE

Dr. Gaetano Gubitosa

nominato con D.P.G.R.C. n. 76 del 10/06/2020

insediatosi giusta deliberazione n. 1 del 11/06/2020

Vista la proposta di deliberazione che precede, a firma del Direttore UOC Provveditorato ed Economato Dott.ssa Antonietta Costantini

Acquisito il parere favorevole del Direttore Sanitario Dr.ssa Angela Anzecchiarico e del Direttore Amministrativo Avv. Amalia Carrara sotto riportati:

Il Direttore Sanitario **Dr.ssa Angela Anzecchiarico** _____

Il Direttore Amministrativo **Avv. Amalia Carrara** _____

DELIBERA

per le causali in premessa, che qui si intendono integralmente richiamate e trascritte, di prendere atto della proposta di deliberazione che precede e, per l'effetto, di:

I - DISPORRE l'affidamento annuale della fornitura dei test sottoelencati, necessari al Settore di Autoimmunità afferente alla UOC Patologia Clinica al fine di espandere l'offerta diagnostica, in favore della Ditta EUROIMMUN ITALIA Srl., aggiudicataria ex deliberazione n.185/2019 del Lotto n.3, per l'importo complessivo scontato di € 7.704,90 oltre Iva al 22%, come di seguito riportato:

Deliberazione del Direttore Generale

Il presente atto, in formato digitale e firmato elettronicamente, costituisce informazione primaria ed originale ai sensi dei combinati disposti degli artt. 23-ter, 24 e 40 del D.Lgs. n. 82/2005. Eventuale riproduzione analogica, costituisce valore di copia semplice a scopo illustrativo.

Codice prodotto	Descrizione	N. Conf. offerte	Prezzo listino x conf.	Prezzo netto x conf. con applicazioni e di scontistica	Prezzo netto x test	Importo Totale Esclusa Iva
EA 1254 - 1005 - 51	Anti THSD7A	2 (50 test cadauna)	1.440,00	1.368,00	27,36000	2.7360,00
EA -1254 - 9601 G	Recettore Fosfolipasi A2	1 (96 test cadauna)	1.150,00	1.092,50	11,38021	1.092,50
EA -1027 - 9601	Anti ZnT8	1 (96 test cadauna)	1.300,00	910,00	9,47917	910,00
EA -1022 - 9601 G	GAD	1 (96 test cadauna)	840,00	588,00	6,12500	588,00
EA -1023 9601 G	IA – 2	1 (96 test cadauna)	840,00	588,00	1,71875	588,00
EA -3608	INSULIN Ab	1 (96 test cadauna)	165,00	165,00	1,7185	165,00
FA 1156 -1003 -50	EA3808	2 (30 test cadauna)	546,00	518,70	17,29000	1.037,40
EA 1435 - 9601 G	Anti – Acetylcholinrecepto r Elisa ELISA	1 (96 test cadauna)	840,00	588,00	6,12500	5878,00

II - DI DARE ATTO che il costo derivante dal presente provvedimento, pari ad € 9.399,98 Iva al 22%, è da imputarsi sul conto economico 5010105010 "Dispositivi medico-diagnostici in vitro" - bilancio 2021 come di seguito indicato:

- a) € 7.049,98 pari a 9/12 sul bilancio 2021;
- b) € 2.349,99 pari a 3/12 sul bilancio 2022;

III - NOTIFICARE il presente provvedimento alla succitata Ditta;

IV - DESIGNARE Direttore dell'esecuzione del contratto la Dott.ssa Anna Dello Stritto, Direttore della UOC Farmacia Ospedaliera;

V - TRASMETTERE copia del presente atto al Collegio Sindacale, ai sensi di legge, alle UU.OO.CC. Gestione Economico - Finanziaria, Farmacia Ospedaliera e Patologia Clinica, per quanto di competenza.

IL DIRETTORE GENERALE
Gaetano Gubitosa

Deliberazione del Direttore Generale

Il presente atto, in formato digitale e firmato elettronicamente, costituisce informazione primaria ed originale ai sensi dei combinati disposti degli artt. 23-ter, 24 e 40 del D.Lgs. n. 82/2005. Eventuale riproduzione analogica, costituisce valore di copia semplice a scopo illustrativo.



REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
"SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO"
CASERTA

ATTESTAZIONE DI VERIFICA E REGISTRAZIONE CONTABILE
(per le proposte che determinano un costo per l'AORN – VEDI ALLEGATO)

Deliberazione del Direttore Generale

Il presente atto, in formato digitale e firmato elettronicamente, costituisce informazione primaria ed originale ai sensi dei combinati disposti degli artt. 23-ter, 24 e 40 del D.Lgs. n. 82/2005. Eventuale riproduzione analogica, costituisce valore di copia semplice a scopo illustrativo.



10/02/2021 17.51-20210004873



REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
"SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO"
CASERTA

U.O.C. Patologia Clinica
Dipartimento dei Servizi Sanitari

del m. 1

Alla c.a.

Direttore Sanitario
Direttore UOC Provveditorato ed Economato
SEDE

Oggetto: introduzione nuovi test di Autoimmunità

Premesso che con richiesta del 21/05/2020, lo scrivente, nell'ottica dell'implementazione dell'attività diagnostica del Settore Autoimmunità della UOC Patologia Clinica, al fine di rendere più puntuale la diagnosi dei dismetabolismi, di talune sindromi neurodegenerative nonché della glomerulonefrite membranosa, aveva richiesto l'attivazione di una serie di dosaggi attualmente non disponibili presso questa AORN ed implementabili nell'ambito del contratto con la ditta Euroimmun, già fornitrice con delibera n.185 del 13/03/2019 di fornitura triennale per reagenti e strumentazioni di autoimmunità

Non avendo ricevuto alcun riscontro, nonostante un sollecito del 13/10/2020, reitera la richiesta precisando che tali arricchimenti diagnostici consentirebbero di elevare gli standard diagnostici dell'AORN Caserta, evitando migrazione verso altri poli regionali.

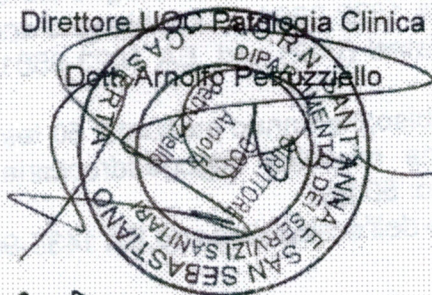
Si allega la richiesta del 21/05/2020 inclusiva di dettaglio test e fabbisogno annuo.

Caserta li, 03/02/2021

Il Direttore del Dipartimento dei Servizi

Direttore UOC Patologia Clinica

Dott. Arnolfo Peruzzello



15/02/2021
MP

09.02

Al Direttore UOC Provveditorato
e p.c. al Direttore Dip. Servizi

Si esprime pareri favorevole alla richiesta
per elemento di competenza

Ture

d

Il Direttore Sanitario

dott.ssa Angela ANNECCHIARICO

UOC Patologia Clinica - Dipartimento dei Servizi Sanitari -

AORN Sant'Anna e San Sebastiano - Caserta

Via Palasciano 81100 - Caserta - Tel. 0823/232764

e-mail: dipartimentoservizisanitari@ospedale.caserta.it; patologiaclinica.dir@ospedale.caserta.it

PEC: _patologiaclinica.pec@ospedale.caserta



REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE
E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
"SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO" DI CASERTA

Alla c.a. del
Direttore UOC Provveditorato

Direttore UOC Farmacia
LL.SS.

Oggetto: Introduzione nuovi test autoimmunità

Nell'ottica della implementazione dell'offerta diagnostica della UOC Patologia Clinica, lo scrivente ravvisa la necessità di espandere il settore di Autoimmunità dedicandosi alla diagnosi di dismetabolismi e sindromi neurodegenerative. In quest'ottica risulta rilevante introdurre la determinazione di autoanticorpi diretti contro il recettore delle glicoproteine fosfolipasi A2 (PLA2R) e della trombospodina di tipo 1 7A) per la diagnosi non invasiva della glomerulonefrite membranosa, nonché della determinazione di autoanticorpi per la diagnosi di diabete mellito insulino-dipendente e per la diagnosi di neuromielite ottica e di miastenia gravis.

Si chiede, pertanto, nell'ambito del contratto n. 4600029486 (ditta EUROIMMUN), l'aggiunta dei seguenti test, attualmente non previsti dal contratto:

- Anticorpi anti proteina trombospodina di tipo 1 7A (THSD7A) cod. FA1254-1005-51
Fabbisogno annuo presunto: 50 test
- Anticorpi anti recettore fosfolipasi A2 (PLA2R) determinazione quantitativa cod. EA 1254-9601 G- Fabbisogno annuo presunto: 50 test
- Anticorpi anti ZnT8 cod. EA 1027-9601- Fabbisogno annuo presunto: 50 test
- Anticorpi anti GAD cod. EA 1022-9601G - Fabbisogno annuo presunto: 50 test
- Anticorpi anti tirosina fosfatasi (IA-2) cod. EA 1023-9601- Fabbisogno annuo presunto: 50 test
- Anticorpi anti Insulina Fabbisogno annuo presunto: 50 test
- Anticorpi anti glicoproteina mielinica oligodendrocitaria (MOG) cod. FA 1156-1003-50
fabbisogno annuo presunto: 50 test
- Autoanticorpi anti recettore dell'acetilcolina cod. EA 1435-9601G fabbisogno presunto annuo: 20 test

Caserta li, 21/05/2020

Il Direttore UOC Patologia clinica
Dott. Arnolfo Petruzzello

A.O.R.N. Sant'Anna e San Sebastiano
CASERTA

U.O.C. Patologia Clinica
Direttore: Dott. Arnolfo Petruzzello

UOC PATOLOGIA CLINICA

Dipartimento dei Servizi Sanitari
Via F. Palasciano - 81100 Caserta

Tel. Direzione: 0823 232764; Segreteria: 0823 232144/2150; Ambulatorio 0823 232132
e.mail: patologiaclinica@ospedale.caserta.it; patologiaclinica.dir@ospedale.caserta.it
Direttore Dott. Arnolfo Petruzzello





REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE
E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
"SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO" DI CASERTA

A.O.O. UOC Affari Generali - Ufficio Protocollo Generale
Protocollo: 0005363/U Data: 16/02/2021 10:05
Ufficio: UFFICIO PROTOCOLLO
Classifica:



all. m. 2

Spett.le Ditta EUROIMMUN

OGGETTO: Fornitura annuale di vari test dedicati al settore Autoimmunità' della UOC Patologia Clinica - Richiesta di offerta

Quest'Azienda, nell'ambito dell'ampliamento dell'offerta diagnostica dedicata alla diagnosi di dismetabolismi e sindromi neurodegenerative da parte della UOC Patologia Clinica, ha necessità di acquistare i test indicati nell'elenco allegato alla presente (ALLEGATO A), predisposto dal Direttore della UOC Patologia Clinica.

Pertanto si chiede a codesta Società, nell'ambito dell'aggiudicazione del Lotto n.3, incluso nella fornitura affidataVi con delibera dell'allora D.G. n.185/2019, di produrre offerta con la massima urgenza, tramite i seguenti punti di contatto: provveditorato@ospedalecasertapec.it oppure provveditorato@ospedale.caserta.it.

L'offerta dovrà contenere:

- la scheda tecnica del prodotto offerto ed indicare i seguenti elementi:
- denominazione commerciale e codice del prodotto offerto;
- prezzo di listino del produttore;
- percentuale di sconto applicata;
- prezzo finale offerto.

Il Responsabile Unico del presente procedimento è la Dott.ssa Antonietta Costantini, Direttore U.O.C. Provveditorato – Economato.

Di seguito si riportano le condizioni di fornitura:

Luogo di consegna: Farmacia AORN "S. ANNA E S. SEBASTIANO" Via G. La Pira, Caserta. Nella bolla di consegna, debitamente datata e numerata, secondo le vigenti disposizioni di legge in materia, dovrà essere indicato il numero del buono d'ordine, oltre alla descrizione del prodotto, la quantità, ecc. La Ditta effettuerà le consegne a proprio rischio e con carico delle spese di qualsiasi natura.

Fatturazione:

Si comunica che l'Azienda Ospedaliera "Sant'Anna e San Sebastiano" di Caserta accetterà le fatture solo nel formato elettronico secondo l'allegato A del DM n.55/2013 e s.m.i, da indirizzare alla medesima Azienda e recanti le seguenti informazioni (come riportato sul sito: www.indicepa.gov.it):

U.O.C. Provveditorato ed Economato
Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale Sant'Anna e San Sebastiano – Caserta
Via Palasciano 81100 - Caserta
Tel. 0823232462
e-mail: provveditorato@ospedale.caserta.it
pec: provveditorato@ospedalecasertapec.it

Denominazione Ente:	Azienda Ospedaliera "Sant'Anna e San Sebastiano" di Caserta
Codice IPA:	aosa_061
Codice Univoco Ufficio:	551B2G
Nome dell'Ufficio:	FATTURAZIONE
Cod. fisc. del Servizio di F.E.:	02201130610
Partita Iva :	02201130610

Pagamento:

Il pagamento avverrà nei 60 (sessanta) giorni dalla data di ricezione delle fatture da parte del Servizio Economico-Finanziario dell'AORN, dopo l'acquisizione del visto di regolare esecuzione del Responsabile della U.O. di destinazione.

Ai sensi e per gli effetti dell'art. 3) della L. n. 136 del 2010 e s.m.i., il Fornitore deve assumere gli obblighi di tracciabilità dei flussi finanziari; pertanto, per non incorrere nella risoluzione del contratto, ai sensi dell'art.3) comma 9 bis della suddetta legge, deve comunicare mediante dichiarazione sostitutiva dell'atto di notorietà - art. 47 DPR 445/2000 - gli estremi del c/c postale o bancario dedicato su cui effettuare i pagamenti, unitamente alle generalità ed al codice fiscale dei soggetti delegati ad operare sul conto, allegando fotocopia dei documenti di riconoscimento. Con la presente, il Fornitore prende atto che il mancato utilizzo del conto corrente postale o bancario ovvero degli altri strumenti che assicurino la tracciabilità dei movimenti finanziari, costituisce causa di risoluzione del contratto ai sensi dell'art. 3), comma 9 bis della Legge citata.

Controversie

Per la soluzione di controversie eventualmente insorte nel corso dell'esecuzione della fornitura, sarà inizialmente tentata la composizione in via amministrativa. In caso di perdurante disaccordo, la risoluzione del contenzioso sarà affidata al competente Tribunale di Santa Maria Capua Vetere.

Norme comuni

Per quanto non previsto espressamente dalla presente, si rinvia alla disciplina comunitaria e nazionale vigente in materia di contratti pubblici.

Si precisa che con la presente richiesta questa Azienda non assume alcun impegno contrattuale e, di conseguenza, può procedere alla revoca della medesima in qualsiasi momento senza ulteriore comunicazione.

Il Direttore U.O.C. Provveditorato - Economato
Dott.ssa Antonietta Costantini

U.O.C. Provveditorato ed Economato

Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale Sant'Anna e San Sebastiano - Caserta

Via Palasciano 81100 - Caserta

Tel. 0823232462

e-mail: provveditorato@ospedale.caserta.it

pec : provveditorato@ospedalecasertapec.it

ELENCO RIEPILOGATIVO – ALLEGATO A

TIPOLOGIA TEST	CODICE IDENTIFICATIVO	FABBISOGNO PRESUNTO ANNUO
Anticorpi anti proteina trombospondina di tipo 1 7 A (THSD7A)	FA1254-1005-51	N.50
Anticorpi anti recettore fosfolipasi A2 (PLA2PR) determinazione quantitativa	EA 1254 -9601 G	N.50
Anticorpi anti ZnT8	EA 1027 - 9601	N.50
Anticorpi anti GAD	EA 1022 - 9601G	N.50
Anticorpi anti tirosina fosfatasi (IA-2)	EA 1023 -9601	N.50
Anticorpi anti insulina	_____	N.50
Anticorpi anti glicoproteina mielinica oligodendrocitaria (MOG)	FA 1156 - 1003 -50	N.50
Anticorpi anti recettore dell'acetilcolina	EA 1435 -9601G	N.20

UOC PATOLOGIA CLINICA
F.TO DOTT. ARNOLFO PETRUZZIELLO

Da "Posta Certificata Cedacri" <posta-certificata@postacert.cedacri.it>

A "provveditorato@ospedalecasertapec.it" <provveditorato@ospedalecasertapec.it>

Data martedì 16 febbraio 2021 - 12:53

Fornitura annuale di vari test dedicati al settore Autoimmunità della UOC Patologia Clinica - Richiesta di Offerta.

Ricevuta di avvenuta consegna

Il giorno 16/02/2021 alle ore 12:53:02 (+0100) il messaggio

"Fornitura annuale di vari test dedicati al settore Autoimmunità della UOC Patologia Clinica - Richiesta di Offerta."

proveniente da "provveditorato@ospedalecasertapec.it"

ed indirizzato a "euroimmun.ufficiogare@cert.neispa.com"

è stato consegnato nella casella di destinazione.

Identificativo messaggio: opec2941.20210216125253.17235.140.1.68@pec.aruba.it

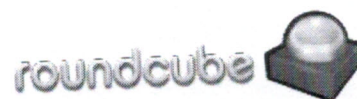
Allegato(i)

dati-cert.xml (1 KB)

postacert.eml (2263 KB)

smime.p7s (8 KB)

Oggetto **Fornitura annuale di vari test dedicati al
settore Autoimmunità - Richiesta**
Mittente <provveditorato@ospedale.caserta.it>
Destinatario <patologiaclinica.dir@ospedale.caserta.it>
Data 24.02.2021 10:57



Handwritten signature in blue ink, appearing to read "elle m. y".

-
- CCF_000010_compressed.pdf(~7,7 MB)
-



REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE
E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
"SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO" DI CASERTA

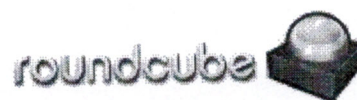
All'UOC Patologia Clinica
Dott. Arnolfo Petruzziello

Oggetto: Fornitura annuale di vari test dedicati al settore Autoimmunità dell'UOC Patologia Clinica – Richiesta.

Al fine di assicurare il corretto svolgimento dell'istruttoria riferita all'acquisizione in oggetto, si rimette in allegato l'offerta formulata dalla Ditta Euroimmun Srl per la prescritta preventiva verifica di conformità.
Restasi in attesa di risposta.

U.O.C. PROVVEDITORATO – ECONOMATO
IL DIRETTORE
Dott.ssa Antonietta Costantini

Oggetto **euroimmun parere conformità**
Mittente <patologiaclinica.dir@ospedale.caserta.it>
Destinatario <provveditorato@ospedale.caserta.it>
Data 03.03.2021 11:45
Priorità Molto alta



- euroimmun_000370.pdf(~713 KB)

Si allega nota in allegato

all m-5

Dr. Arnolfo Petruzzello
Direttore UOC Patologia Clinica
Direttore Dipartimento dei Servizi Sanitari
AORN S. Anna e S. Sebastiano
Via F. Palasciano- Caserta
0823 232764
Patologiaclinica.dir@ospedale.caserta.it
dipartimentoservizisanitari@ospedale.caserta.it

04/03/2021
ME

Fuse

Q

EUROIMMUN Italia Srl con Socio Unico
Corso Stati Uniti, 4 - sc. F - 35127 Padova - Italia
Tel. +39 049 7800178 - Fax +39 049 7808103
C.F. e P. IVA 03680250283 - Iscriz. C.C.I.A.A. n° 328638
Capitale sociale: EURO 90.000,00 i.v.

MD 7201 REV. 2

Documento	Numero	Data	Pagina
Offerta	FV/MB/SEDE/123	16/02/2021	1 / 1
Vs. Numero Riferimento		Del	
prot. 5363/U - Integr. gara SEDE381/2018		16/02/2021	

OGGETTO: fornitura annuale di vari test dedicati al settore Autoimmunità della UOC Patologia Clinica - offerta integr. delibera 185/2019

Spett.le
AO S. ANNA e S. SEBASTIANO CASERTA
UOC Provveditorato Economico
VIA PALASCIANO
81100 CASERTA CE Italia

A seguito Vs. richiesta prot. n. 0005363/U del 16 u.s. e ad integrazione della procedura aggiudicata con delibera n. 185/2019, EUROIMMUN ITALIA S.R.L. con Socio Unico Vi propone di seguito le proprie migliori quotazioni per l'eventuale acquisto del seguente materiale:

Codice Articolo	Descrizione	nr. Conf. Offerte	Test x conf.	Prezzo listino x conf.	Sc.1%	Sc.2%	Sc.3%	Prezzo netto x conf.	Prezzo netto x Test	Importo Totale	Iva %
FA 1254-1005-51	Anti-THSD7A RDM: in fase di registrazione CND W0102109099	2	50	1.440,00	5,00			1.368,00	27,36000	2.736,00	22
										Cig 7496310927	
EA 1254-9901 G	Recettore fosfolipasi A2 CND W0102109099 EDMA 12109090 RDM 1345406/R	3	96	1.150,00	5,00			1.092,50	11,38021	3.277,50	22
										Cig 7496310927	
EA 1027-9901	ANTI ZnT8 RDM: in fase di registrazione CND W0102109099	3	96	1.300,00	30,00			910,00	9,47917	2.730,00	22
										Cig 7496310927	
EA 1022-9901 G	GAD CND W0102060105 EDMA 12060105 RDM 1257468/R	3	96	840,00	30,00			588,00	6,12500	1.764,00	22
										Cig 7496310927	
EA 1023-9901 G	IA-2 CND W0102060106 EDMA 12060107 RDM 1344840/R	3	96	840,00	30,00			588,00	6,12500	1.764,00	22
										Cig 7496310927	
EIA-3808	INSULIN AB CND W0102100101 RDM 1319742	3	96	165,00				165,00	1,71875	495,00	22
										Cig 7496310927	
FA 1156-1003-50	Glicoproteina mielinica oligodendrocytaria (MOG) RDM: in fase di registrazione CND W0102100299	3	30	546,00	5,00			518,70	17,29000	1.556,10	22
										Cig 7496310927	
EA 1435-9901 G	Anti-Acetylcholinreceptor ELISA CND W0102109022 EDMA 12109023 RDM 1345503/R	3	96	840,00	30,00			588,00	6,12500	1.764,00	22
										Cig 7496310927	

Vi preghiamo di restituire la presente firmata per accettazione. Grazie

Note:
E-mail: provveditorato@ospedale.caserta.it
PEC: provveditorato@ospedalecasertapec.it

Condizioni di Fornitura	
Pagamento	TERMINI DI LEGGE PAGO PA
Modalità di consegna	PORTO FRANCO
Consegna	come da Capitolato
Validità ns. offerta	Minimo d'ordine fatturabile
30/04/2022	
Termine periodo fornitura	
30/04/2022	

EUROIMMUN ITALIA S.R.L.

con Socio Unico AO S. Anna e S. Sebastiano CASERTA

Amministratore Delegato Dr. Fabio Valentini
DIRETTORE DEI SERVIZI SANITARI
Direttore: Dott. ARNOLFO PETRUZZIELLO

Da "provveditorato@ospedalecasertapec.it" <provveditorato@ospedalecasertapec.it>

A "euroimmun" <euroimmun.ufficiogare@cert.neispa.com>

Data lunedì 29 marzo 2021 - 13:30

lotto n.3 Patologia Clinica ditta Euroimmun

A seguito della disamina della Vs. offerta, datata 16.02.2021, è emerso che i quantitativi proposti a questa azienda non coincidono - fatta eccezione del riferimento 1 - con il fabbisogno stimato (vedasi allegato A alla richiesta di offerta prot. generale n.5363 2021) dal Direttore dell'UOC Patologia Clinica, che legge per conoscenza ; pertanto si chiede di allineare l'offerta già formulata ai nostri fabbisogni, con specifica delle relative quotazioni. Restasi in attesa di urgente risposta, si da garantire la definizione della propcedura.

UOC Provveditorato ed Economato

oll. M.5

Da "Posta Certificata Cedacri" <posta-certificata@postacert.cedacri.it>
A "provveditorato@ospedalecasertapec.it" <provveditorato@ospedalecasertapec.it>
Data lunedì 29 marzo 2021 - 13:30

lotto n.3 Patologia Clinica ditta Euroimmun

Ricevuta di avvenuta consegna

Il giorno 29/03/2021 alle ore 13:30:06 (+0200) il messaggio

"lotto n.3 Patologia Clinica ditta Euroimmun" proveniente da "provveditorato@ospedalecasertapec.it"

ed indirizzato a "euroimmun.ufficiogare@cert.neispa.com"

è stato consegnato nella casella di destinazione.

Identificativo messaggio: opec2941.20210329133000.20106.358.1.66@pec.aruba.it

Allegato(i)

datacert.xml (1 KB)

postacert.eml (3 KB)

smime.p7s (8 KB)

Da "Euroimmun Ufficio Gare" <euroimmun.ufficiogare@cert.neispa.com>

A "provveditorato@ospedalecasertapec.it" <provveditorato@ospedalecasertapec.it>

Data martedì 30 marzo 2021 - 12:21

EUROIMMUN ITALIA - OFF INTEGRATIVA lotto n.3 Patologia Clinica - SEDE123/2021 - AO S. ANNA E S. SEBASTIANO CASERTA

Spett.le Servizio,

in allegato trasmettiamo offerta rivista nei quantitativi come da Vs. richiesta.

Cordiali saluti.

Alberta Favero

Tenders and Contracts Assistant



Corso Stati Uniti, 4 Scala F
35127 Padova
Cell. +39 340 1201314
Tel. +39 049 7800 178 - int. 2
Fax. +39 049 7808 103
E-mail: a.favero@euroimmun.it
Web: www.euroimmun.it



contattare

*E' identico X
c'è un'aggiunta sulle
Dott. SSE
ceduto*

3480848929

Le informazioni contenute nella presente comunicazione e i relativi allegati possono essere riservate e sono, comunque, destinate esclusivamente ai destinatari sopraindicati. La diffusione, distribuzione e/o copiatura del documento trasmesso da parte di qualsiasi soggetto diverso dal destinatario è proibita, sia ai sensi dell'art. 616 c.p., che ai sensi del Regolamento (UE) 2016/679 e del D.Lgs. 101 del 10/08/2018. Se avete ricevuto questo messaggio per errore, vi preghiamo di distruggerlo e di informarci immediatamente inviando un messaggio all'indirizzo e-mail privacy@euroimmun.it

The information in this e-mail and any attachments with it, is confidential and may also be legally privileged. It is intended for the addressee only. Access to this e-mail by anyone else is unauthorized. It is not to be relied upon by any person other than the addressee, except with our prior written approval. If no such approval is given, we will not accept any liability arising from any third party acting, or refraining from acting on such information. Unauthorized recipients are required to maintain confidentiality. If you have received this e-mail in error please destroy any copies and delete it from your computer system, then inform us immediately sending a message to privacy@euroimmun.it

Da: provveditorato@ospedalecasertapec.it <provveditorato@ospedalecasertapec.it>

Inviato: lunedì 29 marzo 2021 13:30

A: euroimmun <euroimmun.ufficiogare@cert.neispa.com>

Oggetto: lotto n.3 Patologia Clinica ditta Euroimmun

*01/04/2021
Tuse*

A seguito della disamina della Vs. offerta, datata 16.02.2021, è emerso che i quantitativi proposti a questa azienda non coincidono - fatta eccezione del riferimento 1 - con il fabbisogno stimato (vedasi allegato A alla richiesta di offerta prot. generale n.5363 2021) dal Direttore dell'UOC Patologia Clinica, che legge per conoscenza, pertanto si chiede di allineare l'offerta già formulata ai nostri fabbisogni, con specifica delle relative quotazioni.
Restasi in attesa di urgente risposta, si da garantire la definizione della procedura.

UOC Provveditorato ed Economato

Allegato(i)

Documento	Numero	Data	Pagina
Offerta	FV/MB/SEDE/123	16/02/2021	1 / 1
Vs. Numero Riferimento		Del	
prot. 5363/U - integr gara SEDE381/2018		16/02/2021	

Spett.le
AO S. ANNA e S. SEBASTIANO CASERTA
UOC Provveditorato Economico
VIA PALASCIANO
81100 CASERTA CE Italia

OGGETTO: fornitura annuale di vari test dedicati al settore Autoimmunità della UOC Patologia Clinica - offerta integr. delibera 185/2019

A seguito Vs. richiesta prot. n. 0005363/U del 16 u.s. e PEC del 29 c.m., e ad integrazione della procedura aggiudicata con delibera n. 185/2019, rettifichiamo la ns. offerta presentata in data 16/02/2021 con la seguente:

Codice Articolo	Descrizione	nr. Conf. Offerta	Test x conf.	Prezzo listino x conf.	Sc.1%	Sc.2%	Sc.3%	Prezzo netto x conf.	Prezzo netto x Test	Importo Totale	Iva %
FA 1254-1005-51	Anti-THSD7A RDM: in fase di registrazione CND W0102109099	2	50					1.368,00	27,36000	2.736,00	22
EA 1254-9601 G	Recettore fosfolipasi A2 CND W0102109099 EDMA 12109090	1	96					1.092,50	11,38021	1.092,50	22
EA 1027-9601	RDM 1345406/R ANTI Zn/T8	1	96					910,00	9,47917	910,00	22
EA 1022-9501 G	RDM: in fase di registrazione CND W0102109099	1	96					588,00	6,12500	588,00	22
EA 1023-9601 G	GAD CND W0102060105 EDMA 12060105	1	96					588,00	6,12500	588,00	22
EA 1023-9601 G	RDM 1257468/R IA-2	1	96					588,00	6,12500	588,00	22
EIA-3608	CND W0102060106 EDMA 12060107 RDM 1344840/R	1	96					165,00	1,71875	165,00	22
FA 1156-1003-50	INSULIN Ab CND W0102100101 RDM 1319742	2	30					518,70	17,29000	1.037,40	22
EA 1435-9601 G	Glicoproteina mielinica oligodendrocitaria (MOG) RDM: in fase di registrazione CND W0102100299	1	96					588,00	6,12500	588,00	22
	Anti-Acetylcholinreceptor ELISA CND W0102109022 EDMA 12109023										
	RDM 1345503/R										

Vi preghiamo di restituire la presente firmata per accettazione. Grazie

Note

E-mail: provveditorato@ospedale.caserta.it

PEC: provveditorato@ospedalecasertapec.it

Condizioni di Fornitura	
Pagamento	
TERMINE DI LEGGE PAGO PA	
Modalità di consegna	
PORTO FRANCO	
Consegna	
come da Capitolato	
Validità ns. offerta	Minimo d'ordine fattureabile
30/04/2022	
Termine periodo fornitura	
30/04/2022	

EUROIMMUN ITALIA SRL
con Socio Unico
Procuratore Speciale
30/04/2022

Da: euroimmun.ufficiogare@cert.neispa.com
Inviato: giovedì 1 aprile 2021 14:35
A: provveditorato@ospedalecasertapec.it
Cc: angelo.petruzziello@ospedale.caserta.it; provveditorato@ospedale.caserta.it
Oggetto: FORNITURA ANNUALE DI VARI TEST DEDICATI AL SETTORE AUTOIMMUNITA' DELLA UOC PATOLOGIA CLINICA - offerta integrativa delibera 185/2019 lotto n. 3 - ns. rif. offerta FV/MB/SEDE/123 del 16/02/2021

Gentilissimi,
facendo seguito alla Vs. richiesta del 29/03/2021, alla ns. successiva PEC del 30/03/2021 ed al chiarimento telefonico con la dott.ssa Capobianco, si precisa che i kit con codice "EA" ed "EIA" presenti nella ns. offerta di cui all'oggetto sono di confezionamento unico da 96 test (come esplicitato nella colonna "test per confezione" presente nell'offerta stessa) e non frazionabili. Si aggiunge altresì che, per effettuare i test richiesti dal laboratorio, ciascuna seduta richiede l'utilizzo di altri pozzetti, necessari per la calibrazione e i controlli interni. Di conseguenza, il numero dei referti producibili con un kit non sarà più pari a 96, bensì varierà a seconda del numero di campioni processati e della frequenza delle sedute. Da qui deriva il quantitativo proposto nella ns. offerta iniziale, in cui si consideravano le calibrazioni necessarie ad ogni seduta nonché le scadenze dei kit una volta aperti.

A disposizione per ulteriori chiarimenti in merito, porgiamo distinti saluti.

Marianna Biasio
Tenders and Contracts Desk

EUROIMMUN
a PerkinElmer company



ITALY

Corso Stati Uniti, 4 Scala F
35127 Padova
Tel. +39 049 7800 178
Fax. +39 049 7808 103
E-mail: m.biasio@euroimmun.it
Web: www.euroimmun.it



*Dr. ne Capobianco
2/04/2021*

Le informazioni contenute nella presente comunicazione e i relativi allegati possono essere riservate e sono, comunque, destinate esclusivamente ai destinatari sopraindicati. La diffusione, distribuzione e/o copiatura del documento trasmesso da parte di qualsiasi soggetto diverso dal destinatario è proibita, sia ai sensi dell'art. 616 c.p., che ai sensi del Regolamento (UE) 2016/679 e del D.Lgs. 101 del 10/08/2018. Se avete ricevuto questo messaggio per errore, vi preghiamo di distruggerlo e di informarci immediatamente inviando un messaggio all'indirizzo e-mail privacy@euroimmun.it.
The information in this e-mail and any attachments with it, is confidential and may also be legally privileged. It is intended for the addressee only. Access to this e-mail by anyone else is unauthorised. It is not to be relied upon by any person other than the addressee, except with our prior written approval. If no such approval is given, we will not accept any liability arising from any third party acting, or refraining from acting on such information. Unauthorised recipients are required to maintain confidentiality. If you have received this e-mail in error please destroy any copies and delete it from your computer system, then inform us immediately sending a message to privacy@euroimmun.it.

20/10/2020
a mezza V. Collet
alle 10.00
se ne va in
nerv. le conf. med
quello in de ve
X Dott. R. R. R. R.

Da "euroimmun.ufficiogare@cert.neispa.com" <euroimmun.ufficiogare@cert.neispa.com>
A "provveditorato@ospedalecasertapec.it" <provveditorato@ospedalecasertapec.it>
Cc "provveditorato@ospedale.caserta.it" <provveditorato@ospedale.caserta.it>
Data lunedì 22 febbraio 2021 - 10:18

ell. M.3

R: Fornitura annuale di vari test dedicati al settore Autoimmunità della UOC Patologia Clinica - Richiesta di Offerta.

Gentile Cliente,

a seguito Vs. richiesta prot. n. 0005363/U del 16 u.s., siamo con la presente ad inviare ns. migliore offerta economica e relativa documentazione.

L'occasione è gradita per porgere distinti saluti.

Marianna Biasio
Tenders and Contracts Desk



Corso Stati Uniti, 4 Scala F
35127 Padova
Tel. +39 049 7800 178
Fax. +39 049 7808 103
E-mail: m.biasio@euroimmun.it
Web: www.euroimmun.it



Carlo
in le
workplace
lett. per ufficio
23/02/2021
NE

Le informazioni contenute nella presente comunicazione e i relativi allegati possono essere riservate e sono, comunque, destinate esclusivamente ai destinatari sopraindicati. La diffusione, distribuzione e/o copiatura del documento trasmesso da parte di qualsiasi soggetto diverso dal destinatario è proibita, sia ai sensi dell'art. 616 c.p., che ai sensi del Regolamento (UE) 2016/679 e del D.Lgs. 101 del 10/08/2018. Se avete ricevuto questo messaggio per errore, vi preghiamo di distruggerlo e di informarci immediatamente inviando un messaggio all'indirizzo e-mail privacy@euroimmun.it

The information in this e-mail and any attachments with it, is confidential and may also be legally privileged. It is intended for the addressee only. Access to this e-mail by anyone else is unauthorised. It is not to be relied upon by any person other than the addressee, except with our prior written approval. If no such approval is given, we will not accept any liability arising from any third party acting, or refraining from acting on such information. Unauthorised recipients are required to maintain confidentiality. If you have received this e-mail in error please destroy any copies and delete it from your computer system, then inform us immediately sending a message to privacy@euroimmun.it

Da: provveditorato@ospedalecasertapec.it [mailto:provveditorato@ospedalecasertapec.it]

Inviato: martedì 16 febbraio 2021 12:53

A: euroimmun <euroimmun.ufficiogare@cert.neispa.com>

Oggetto: Fornitura annuale di vari test dedicati al settore Autoimmunità della UOC Patologia Clinica - Richiesta di Offerta.

Tense

2

Si trasmette in allegato la nota prot. 5363/U del 16.02.2021 indicata in oggetto.
Si resta in attesa di riscontro
Cordiali saluti

Allegato(i)

SEDE123 - offerta CASERTA AO SS ANNA E SEBASTIANO.zip (3294 KB)



Spettabile
AZIENDA OSPEDALIERA DI CASERTA
"S. ANNA E S. SEBASTIANO"
U.O.C. Provveditorato ed Economato
Via Palasciano
81100 CASERTA (CE)

E-mail: provveditorato@ospedale.caserta.it
PEC: provveditorato@ospedalecasertapec.it

Padova, 22/02/2021

Ns. rif.: FV/MB/SEDE/123 del 16/02/2021
Vs. rif.: Vs. prot. n. 0005363/U del 16/02/2021

Oggetto: **INTEGRAZIONE GARA**
Fornitura annuale di vari test dedicati al settore Autoimmunità della UOC
Patologia Clinica - Richiesta di offerta

Procedura aperta per l'affidamento triennale della fornitura di Sistemi Diagnostici completi per l'UOC di Patologia Clinica dell'AORN "S. ANNA" e "S. SEBASTIANO" di Caserta. Gara n. 7091617 - LOTTO N. 3 "Profili diagnostici in immunoblot" - CIG 7498310927

Ns. rif. gara: AG/CD/SEDE/381 del 29/05/2018
Delibera di aggiudicazione n. 185 del 13/03/2019

DICHIARAZIONE AI SENSI DEL DPR 445/2000

Il sottoscritto dott. **FABIO VALENTI**, nato a Castelfranco Veneto (TV) - 31033 - il 06/09/1963 ed ivi residente in Via Catalani, 17, codice fiscale **VLNFBA63P06C111H**, nella sua qualità di Amministratore Delegato della ditta **"Euroimmun Italia S.r.l. con Socio Unico"** con sede in Padova, Corso Stati Uniti, 4, scala F, codice fiscale e partita I.V.A. n. 03680250283, iscritta alla Camera di Commercio di Padova al nr. 328638 dal 04/12/2001,

consapevole delle sanzioni penali previste dall'art. 76 D.P.R. n. 445/2000, nel caso di mendaci dichiarazioni, falsità negli atti, uso o esibizione di atti falsi, contenenti dati non più rispondenti a verità,

D I C H I A R A

di assumere gli obblighi di tracciabilità dei flussi finanziari e, a tal fine, comunica i seguenti dati:

Ragione e/o denominazione sociale **EUROIMMUN ITALIA SRL CON SOCIO UNICO**
Indirizzo Corso Stati Uniti n. 4 scala F - 35127 Padova PD
Part. IVA 03680250283 Cod. Fisc. 03680250283
Tel. 0497800178 Fax 0498077659 E-Mail amministrazione@euroimmun.it

CONTO CORRENTE DEDICATO ai sensi del comma 7), art. 3, L. n. 136/2010, non in via esclusiva:

- nr. cc. 000103984632 - Istituto UNICREDIT SPA - Agenzia 00922 Padova Corso Stati Uniti

EUROIMMUN Italia S.r.l. con Socio Unico - Corso Stati Uniti, 4 - scala F - 35127 Padova - Italia

Tel. +39 049 7800178 - Fax +39 049 7808103

C. F. e P. IVA 03680250283 • Iscriz. C.C.I.A.A. n° 328638

Capitale sociale: EURO 90.000,00



IBAN IT39 P020 0812 1020 0010 3984 632

ALTRI CONTI CORRENTI DEDICATI ai sensi del comma 7), art. 3, L. n. 136/2010, non in via esclusiva:

- nr. cc. 269103931108 - Istituto INTESA SANPAOLO SPA - Ag. 6516 Via Valeri PD
IBAN IT46 T030 6912 1362 6910 3931 108
- nr. cc. 9090 - Istituto BANCA NAZIONALE DEL LAVORO - Ag. 2 Padova
IBAN IT36 U010 0512 1020 0000 0009 090

Persona/e delegata/e ad operare sui conti:

NOME FABIO COGNOME VALENTI
CODICE FISCALE VLNFBA63P06C111H
DATA DI NASCITA 06/09/1963 LUOGO CASTELFRANCO VENETO Prov. TV

Eventuali variazioni ai dati trasmessi, verranno comunicate tempestivamente.

In fede,


EUROIMMUN ITALIA SRL
con Socio Unico
Amministratore Delegato
Dr. Fabio Valenti

Italia
Diagnostica Medica
S.r.l.





Spettabile
AZIENDA OSPEDALIERA DI CASERTA
"S. ANNA E S. SEBASTIANO"
U.O.C. Provveditorato ed Economato
Via Palasciano
81100 CASERTA (CE)

E-mail: provveditorato@ospedale.caserta.it
PEC: provveditorato@ospedalecasertapec.it

Padova, 22/02/2021

Ns. rif.: FV/MB/SEDE/123 del 16/02/2021
Vs. rif.: Vs. prot. n. 0005363/U del 16/02/2021

Oggetto: **INTEGRAZIONE GARA**
Fornitura annuale di vari test dedicati al settore Autoimmunità della UOC
Patologia Clinica - Richiesta di offerta

Procedura aperta per l'affidamento triennale della fornitura di Sistemi Diagnostici completi per l'UOC di Patologia Clinica dell'AORN "S. ANNA" e "S. SEBASTIANO" di Caserta. Gara n. 7091617 - LOTTO N. 3 "Profili diagnostici in immunoblot" - CIG 7498310927

Ns. rif. gara: AG/CD/SEDE/381 del 29/05/2018
Delibera di aggiudicazione n. 185 del 13/03/2019

Il sottoscritto dott. **FABIO VALENTI**, nato a Castelfranco Veneto (TV) - 31033 - il 06/09/1963 ed ivi residente in Via Catalani, 17, codice fiscale **VLNFBA63P06C111H**, nella sua qualità di Amministratore Delegato della ditta "Euroimmun Italia S.r.l. con Socio Unico" con sede in Padova, Corso Stati Uniti, 4, scala F, codice fiscale e partita I.V.A. n. 03680250283, iscritta alla Camera di Commercio di Padova al nr. 328638 dal 04/12/2001,

a l l e g a

- offerta economica redatta come da Voi richiesto;
- schede tecniche dei prodotti proposti;
- dichiarazione, resa ai sensi del DPR 445/2000, attestante l'assunzione degli obblighi di cui alla Legge 136/2010, art. 3, e riportante gli estremi del c/c bancario dedicato su cui effettuare i pagamenti, unitamente alle generalità ed al codice fiscale dei soggetti delegati ad operare sul conto, resa dal ns. Amministratore Delegato dott. Valenti e corredata da copia di un documento di identità del sottoscrittore.

Distinti saluti.

EUROIMMUN ITALIA SRL
con Socio Unico
Amministratore Delegato
Dr. Fabio Valenti

Documento	Numero	Data	Pagina
Offerta	FV/MB/SEDE/123	16/02/2021	1 / 1
Vs. Numero Riferimento		Del	
prot. 5363/U - integr. gara SEDE381/2018		16/02/2021	

Spett.le
AO S. ANNA e S. SEBASTIANO CASERTA
UOC Provveditorato Economato
VIA PALASCIANO
81100 CASERTA CE Italia

OGGETTO: fornitura annuale di vari test dedicati al settore Autoimmunità della UOC Patologia Clinica - offerta Integr. delibera 185/2019

A seguito Vs. richiesta prot. n. 0005363/U del 16 u.s. e ad integrazione della procedura aggiudicata con delibera n. 185/2019, EUROIMMUN ITALIA S.R.L. con Socio Unico Vi propone di seguito le proprie migliori quotazioni per l'eventuale acquisto del seguente materiale:

Codice Articolo	Descrizione	nr. Conf. Offerta	Test x conf.	Prezzo listino x conf.	Sc.1%	Sc.2%	Sc.3%	Prezzo netto x conf.	Prezzo netto x Test	Importo Totale	Iva %
FA 1254-1005-51	Anti-THSD7A RDM: in fase di registrazione CND W0102109099	2	50	1.440,00	5,00			1.368,00	27,36000	2.736,00	22
EA 1254-9601 G	Recettore fosfolipasi A2 CND W0102109099 EDMA 12109090 RDM 1345406/R	3	96	1.150,00	5,00			1.092,50	11,38021	3.277,50	22
EA 1027-9601	ANTI Zn/T8 RDM: in fase di registrazione CND W0102109099	3	96	1.300,00	30,00			910,00	9,47917	2.730,00	22
EA 1022-9601 G	GAD CND W0102060105 EDMA 12060105 RDM 1257468/R	3	96	840,00	30,00			588,00	6,12500	1.764,00	22
EA 1023-9601 G	IA-2 CND W0102060106 EDMA 12060107 RDM 1344840/R	3	96	840,00	30,00			588,00	6,12500	1.764,00	22
EIA-3608	INSULIN Ab CND W0102100101 RDM 1319742	3	96	165,00				165,00	1,71875	495,00	22
FA 1156-1003-50	Glicoproteina mielinica oligodendrocitaria (MOG) RDM: in fase di registrazione CND W0102100299	3	30	546,00	5,00			518,70	17,29000	1.556,10	22
EA 1435-9601 G	Anti-Acetylcholinreceptor ELISA CND W0102109022 EDMA 12109023 RDM 1345503/R	3	96	840,00	30,00			588,00	6,12500	1.764,00	22

Vi preghiamo di restituire la presente firmata per accettazione. Grazie

Note

E-mail: provveditorato@ospedale.caserta.it
PEC: provveditorato@ospedalecasertapec.it

Condizioni di Fornitura

Pagamento

TERMINE DI LEGGE PAGO PA

Modalità di consegna

PORTO FRANCO

Consegna

come da Capitolato

Validità ns. offerta

30/04/2022

Minimo d'ordine fatturevole

Termine periodo fornitura

30/04/2022

EUROIMMUN ITALIA SRL
con Socio Unico
Amministratore Delegato
Dr. Fabio Valent

Anti-GAD ELISA (IgG)

Scheda tecnica

CODICE NO.	ANTICORPI ANTI	CLASSE IG	SUBSTRATO	FORMATO
EA 1022-9601 G	Acido Glutammico Decarbossilasi (GAD)	IgG	Ag coattati nei pozzetti della micropiastra	96 x 01 (96)

Indicazioni: Il kit ELISA permette una determinazione quantitativa in vitro nel siero o nel plasma di autoanticorpi umani diretti contro l'acido glutammico decarbossilasi (GAD), per supportare la diagnosi del diabete mellito di tipo I (diabete mellito insulino-dipendente, IDDM).

Applicazione: Gli autoanticorpi diretti contro l'isoforma da 65 kDa del glutammato decarbossilasi sono rilevabili in fino al 90% di tutti i pazienti nel momento in cui viene a loro diagnosticato il diabete mellito di tipo 1, e può essere determinato anche anni prima dell'insorgenza dei sintomi clinici della malattia. Prima dell'insorgenza della malattia, sono indicatori di un rischio individuale alto per il diabete. La determinazione degli autoanticorpi anti-GAD consente la diagnosi precoce del diabete mellito di tipo 1, che si manifesta soprattutto già dall'infanzia. Negli adulti, le manifestazioni tardive del diabete di tipo 1 (LADA, diabete autoimmune latente nell'adulto) possono essere diagnosticate con certezza mediante la determinazione degli autoanticorpi.

Principio del test: il kit contiene una micropiastra con strip dotate ciascuna di 8 pozzetti frazionabili coattati con GAD. Nella prima reazione, i campioni vengono incubati nei pozzetti. Nel caso di campioni positivi, anticorpi specifici si legano al GAD. Questi anticorpi specifici agiscono in modo bivalente formando un ponte tra il GAD, coattato sul pozzetto, ed il GAD biotinilato che viene aggiunto eseguendo una seconda incubazione. Per determinare il GAD biotinilato, legatosi agli anticorpi, si esegue una terza incubazione utilizzando un enzima coniugato con l'avidina (coniugato enzimatico), in grado di promuovere una reazione colorimetrica. L'intensità della colorazione registrata è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi anti-GAD presenti nel campione testato.

Contenuto del kit:

Componente	Colore	Formato	Simbolo
1. Micropiastra con antigeni coattati nei pozzetti 12 strip ciascuna di 8 pozzetti frazionabili, pronta per l'uso	---	12 x 8	[STRIPS]
2. Calibratori 1 - 6 2000/250/120/35/15/5 UI/ml (IgG, umane), pronti per l'uso	Incolore	6 x 0,7 ml	[CAL 1] - [CAL 6]
3. Controllo Negativo , 0 UI/ml (IgG, umane), pronto per l'uso	Incolore	1 x 0,7 ml	[NEG CONTROL]
4. Controllo Positivo , (IgG, umane), pronto per l'uso	Incolore	1 x 0,7 ml	[POS CONTROL]
5. GAD , GAD biotinilato, liofilizzato	Incolore	3 x 5,5 ml	[GAD]
6. Tampone per GAD , pronto per l'uso	Rosa	2 x 15 ml	[GAD BUFFER]
7. Coniugato enzimatico avidina coniugata alla perossidasi, concentrata 20x	Incolore	1 x 0,7 ml	[CONJUGATE 20x]
8. Tampone del coniugato , pronto per l'uso	Incolore	1 x 15 ml	[CONJ BUFFER]
9. Tampone di lavaggio , concentrato 10x	Incolore	1 x 125 ml	[WASH BUFFER 10x]
10. Cromogeno/substrato , TMB/H ₂ O ₂ , pronto per l'uso	Incolore	1 x 15 ml	[SUBSTRATE]
11. Soluzione d'arresto acido solforico 0,25 M, pronta per l'uso	Incolore	1 x 12 ml	[STOP SOLUTION]
12. Foglio plastificato		3	[FOIL]
13. Certificato del controllo di qualità	---	1	
14. Scheda tecnica (istruzione per l'uso)	---	1	
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div> [LOT] Descrizione del lotto [IVD] Dispositivo medico-diagnostico in vitro </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div>  Temperatura di conservazione  Utilizzabile integro fino al </div> </div>			



Preparazione e stabilità dei reagenti

Nota: Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C) circa 30 minuti prima dell'uso. Dopo il primo utilizzo, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati ad una temperatura tra +2°C e +8°C e protetti da contaminazioni, salvo diverse indicazioni riportate di seguito.

- **Pozzetti coattati:** Aprire l'involucro protettivo richiudibile in corrispondenza degli incavi posizionati sopra la chiusura a pressione. Aprire l'involucro solo quando le strip hanno raggiunto la temperatura ambiente per evitare la formazione di condensa sulla superficie dei pozzetti. Riposizionare immediatamente i pozzetti non utilizzati nell'involucro protettivo e sigillarlo utilizzando la chiusura a pressione (non rimuovere il sacchetto deumidificatore). Una volta aperto l'involucro, i pozzetti coattati con l'antigene possono essere conservati in un luogo asciutto ad una temperatura tra +2°C e +8°C per 4 mesi.
- **Calibratori e controlli:** Pronti per l'uso. I reagenti devono essere miscelati con cura prima dell'utilizzo.
- **GAD:** Liofilizzato. Ricostituire i contenuti di una fiala con 5,5 ml di tampone per GAD. Qualora sia necessario utilizzare più di una fiala di GAD, unire il contenuto ricostituito di ogni fiala in un unico recipiente e miscelare accuratamente prima dell'utilizzo. Evitare la formazione di bolle d'aria. La soluzione di GAD è stabile per un massimo di 3 giorni alla temperatura tra +2°C e +8°C.
- **Coniugato enzimatico:** Il coniugato enzimatico è concentrato 20x. La quantità richiesta deve essere prelevata dalla fiala utilizzando una pipetta pulita e diluita 1:20 con il tampone del coniugato (1 parte di reagente + 19 parti di tampone di coniugato). Miscelare accuratamente prima dell'uso. Il coniugato enzimatico diluito è stabile per un massimo di 16 settimane tra +2°C e +8°C.
- **Tampone di lavaggio:** Il tampone di lavaggio è concentrato 10x. Se nel tampone concentrato si dovessero formare dei cristalli, riscaldarlo a +37°C e miscelare con cura prima di diluirlo. La quantità richiesta deve essere prelevata dal flacone, usando puntali puliti, e diluita con acqua deionizzata o distillata (1 parte di reagente + 9 parti di acqua distillata).
Ad esempio: Per 1 strip, diluire 5 ml di tampone concentrato in 45 ml di acqua.
Il tampone correttamente diluito rimane stabile fino alla data di scadenza indicata se conservato tra +2°C e +8°C e correttamente utilizzato.
- **Soluzione cromogeno/substrato:** Pronta per l'uso. Chiudere il flaconcino immediatamente dopo l'uso, poiché il contenuto è sensibile alla luce ☼. La soluzione deve essere incolore. Non utilizzare la soluzione se presenta una colorazione blu.
- **Soluzione d'arresto:** Pronta per l'uso.

Conservazione e stabilità: Il kit test deve essere conservato a una temperatura compresa tra +2°C e +8°C. Non congelare. Se mantenuti integri, tutti i componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata.

Smaltimento dei residui: I campioni del paziente, i calibratori, i controlli e le strip incubate devono essere trattati come rifiuti con rischio infettivo. Tutti i reagenti devono essere smaltiti in base alla normativa locale vigente.

Avvertenze: I calibratori ed i controlli di origine umana sono risultati negativi per HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Nonostante ciò, i materiali devono essere gestiti come potenzialmente infettivi e maneggiati con cura. Alcuni reagenti contengono sodio azide in una concentrazione inferiore alla soglia dichiarabile. Evitare il contatto con la pelle.

Preparazione e stabilità dei campioni

Campioni: Siero umano, plasma EDTA.

Stabilità: I campioni da testare possono essere conservati tra +2°C e +8°C fino a 14 giorni. I campioni da analizzare possono essere conservati a -20°C o a una temperatura inferiore. Ripetuti congelamenti e scongelamenti sono da evitare.



Esecuzione del test

Per analisi quantitative incubare i **calibratori da 1 a 6** assieme al controllo negativo, al controllo positivo ed ai campioni da testare.

Incubazione del campione:

(1° passaggio)

Trasferire **25 µl** dei calibratori, dei controlli positivo e negativo e dei campioni nei singoli pozzetti seguendo il protocollo di lavoro. Coprire la piastra ed incubare per **1 ora** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C) su di un **agitatore di piastra a 500 rpm**.

Lavaggio:

Manuale: Rimuovere il foglio plastificato e svuotare i pozzetti e successivamente lavare per 3 volte utilizzando 350 µl di tampone di lavaggio correttamente diluito per ciascun pozzetto.

Automatico: Lavare i pozzetti per 3 volte con 450 µl di tampone di lavaggio diluito (esempio di impostazione del programma: TECAN Columbus Washer "Overflow Mode").

Per ogni ciclo di lavaggio, lasciare il tampone di lavaggio per 30 a 60 secondi in ciascun pozzetto, quindi svuotare i pozzetti. Dopo il lavaggio (manuale e automatico), capovolgere la piastra e rimuovere tutto il tampone di lavaggio residuo battendo vigorosamente su della carta assorbente.

Le posizioni libere della strip devono essere riempite con pozzetti vuoti dello stesso formato di quelli utilizzati per il parametro da analizzare.

Incubazione del GAD biotinilato:

(2° passaggio)

Depositare **100 µl** di GAD biotinilato in ciascun pozzetto della micropiastra. Coprire la piastra.

Incubare per **1 ora** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C) su di un **agitatore di piastra a 500 rpm**.

Lavaggio:

Svuotare i pozzetti. Lavare come descritto sopra.

Incubazione del coniugato:

(3° passaggio)

Depositare **100 µl** del coniugato enzimatico (avidina coniugata con la perossidasi) in ciascun pozzetto della micropiastra. Coprire la piastra.

Incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C) su di un **agitatore di piastra a 500 rpm**.

Lavaggio:

Svuotare i pozzetti. Lavare come descritto sopra.

Nota: Residui di liquido (>10 µl) che rimangono all'interno di ogni pozzetto, dopo il lavaggio, possono interferire con il substrato ed abbassare i valori di assorbanza registrati dallo spettrofotometro.

Lavaggi insufficienti (i.e. meno di 3 cicli di lavaggio, volumi troppo piccoli di tampone di lavaggio o tempi di lavaggio troppo brevi) possono alzare i valori di assorbanza.

Incubazione del substrato:

(4° passaggio)

Depositare **100 µl** della soluzione cromogeno/substrato in ciascun pozzetto della micropiastra.

Incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C). Proteggere la piastra dalla luce diretta.

Arresto della reazione:

Depositare **100 µl** della soluzione di arresto in ciascun pozzetto della micropiastra nello stesso ordine ed alla stessa velocità con cui si è aggiunta la soluzione cromogeno/substrato.

Misurazione:

La **misura fotometrica** dell'intensità di colore deve essere effettuata a una **lunghezza d'onda di 450 nm e poi a 405 nm** e a una lunghezza d'onda di riferimento tra 620 nm e 650 nm **entro 15 minuti dall'aggiunta della soluzione d'arresto**. Prima di effettuare la misurazione, agitare delicatamente la piastra per assicurare una distribuzione omogenea della soluzione.



Protocollo di lavoro

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C 1	P 1	P 9	P 17								
B	C 2	P 2	P 10	P 18								
C	C 3	P 3	P 11	P 19								
D	C 4	P 4	P 12	P 20								
E	C 5	P 5	P 13	P 21								
F	C 6	P 6	P 14	P 22								
G	neg.	P 7	P 15	P 23								
H	pos.	P 8	P 16	P 24								

Il protocollo riportato sopra per le strip 1-4 è un esempio di analisi quantitativa di 24 campioni di siero (da P 1 a P 24).

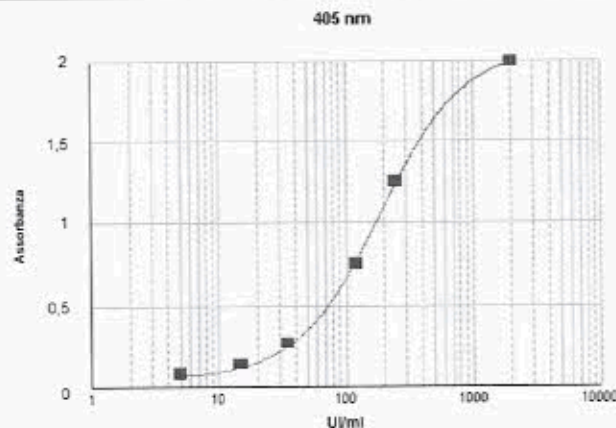
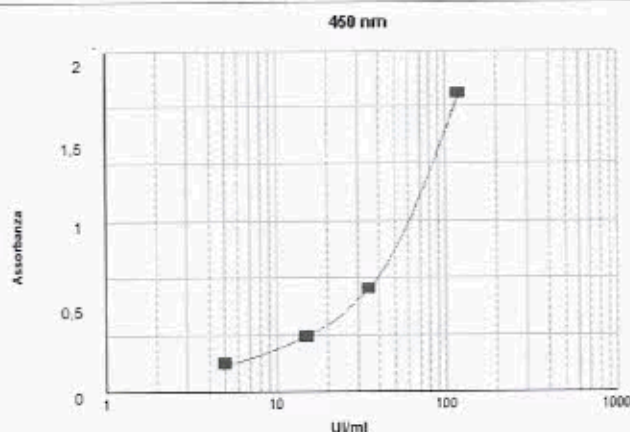
I calibratori (da C 1 a C 6), il controllo positivo (pos.) e negativo (neg.), ed i campioni di siero (P) sono stati incubati in singolo. L'affidabilità del test ELISA può essere migliorata duplicando le determinazioni per ciascun campione.

Sia il controllo positivo che negativo servono da controlli interni per valutare l'affidabilità del test; il loro valore deve essere, quindi, analizzato ad ogni esecuzione del test.

Calcolo dei risultati

Quantitativo: Le curve di calibrazione, utilizzate per determinare la concentrazione degli anticorpi anti-GAD, sono ottenute riportando i valori di assorbanza registrati per i **calibratori 3-6 (450 nm)** o per i **calibratori 1-6 (405 nm)** (scala lineare, asse-y) contro le corrispondenti concentrazioni (scala logaritmica, asse-x). In alternativa, le curve di calibrazione possono essere calcolate mediante computer utilizzando una delle seguenti tecniche di adattamento di curve: modello logistico a quattro-parametri, funzione "spline" o tracciato point-to-point (450 nm). **Le concentrazioni inferiori (<35 UI/ml, calibratore 4)** devono essere lette sulla curva di calibrazione ottenuta a **450 nm** e le **concentrazioni più alte (>35 UI/ml)** sulla curva ottenuta a **405 nm**. I grafici riportati qui di seguito sono un esempio di tipiche curve di calibrazione. Non usate queste curve per la determinazione della concentrazione degli anticorpi anti-GAD nei sieri dei pazienti da testare.

<i>Calibratore / controllo</i>	<i>Assorbanza a 450 nm</i>	<i>Assorbanza a 405 nm</i>
Calibratore 1	>4,00	1,99
Calibratore 2	>4,00	1,25
Calibratore 3	2,62	0,75
Calibratore 4	0,91	0,27
Calibratore 5	0,49	0,14
Calibratore 6	0,25	0,08
Controllo negativo	0,12	0,04



Se l'assorbanza di un siero campione si trova al di sotto del valore del calibratore 6 (5 UI/ml), il risultato deve essere indicato come "<5 UI/ml". Se l'assorbanza di un siero campione si trova al di sopra del valore del calibratore 1 (2000 UI/ml), il risultato deve essere indicato come ">2000 UI/ml". Si consiglia di testare il campione di nuovo in una nuova seduta di analisi ad una diluizione, ad esempio, di 1:20 in un siero anti-GAD negativo. Il risultato, espresso in UI/ml, ottenuto dalla curva di calibrazione per questo siero, deve essere moltiplicato per un fattore 20.

Il limite superiore dei valori normali (**cut-off**) raccomandato da EUROIMMUN è di **10 Unità Internazionali per millilitro (UI/ml)**. EUROIMMUN raccomanda di interpretare i risultati come indicato qui di seguito:

<10 UI/ml: **negativo**
≥10 UI/ml: **positivo**

Per le determinazioni in doppio, si dovrebbe prendere la media dei due valori. Se i due valori si discostano sostanzialmente l'uno dall'altro, EUROIMMUN consiglia di ripetere il test dei campioni.

Per effettuare una diagnosi, è importante considerare, oltre ai risultati sierologici, anche il quadro clinico del paziente.

Caratteristiche del test

Calibrazione: La calibrazione è stata eseguita in Unità Internazionali (UI) utilizzando il primo reagente di riferimento WHO per gli anticorpi diretti contro le cellule delle isole pancreatiche (WHO, 1999, reagente 97/550, National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, Inghilterra). Il reagente di riferimento NIBSC 97/550 contiene per definizione 100 UI di anticorpi anti-GAD65 per boccetta. 25 UI/ml corrispondono ad 1 UR/ml (unità relativa per millilitro) utilizzata nel kit EUROIMMUN RIA anti-GAD.

Per ciascun gruppo di test eseguito, le unità internazionali determinate per i controlli positivi e negativi devono trovarsi all'interno dei limiti indicati per lo specifico lotto. Nel kit è contenuto un certificato del controllo di qualità dove sono riportati questi valori di riferimento. Se i valori specificati per i controlli non vengono raggiunti, i risultati del test possono essere inesatti e il test deve essere ripetuto.

Antigene: I singoli pozzetti della micropiastra sono stati coattati con l'Acido Glutammico Decarbossilasi ricombinante umana, isoforma GAD65. Lo stesso antigene è stato utilizzato per la coniugazione con la biotina.

Limite di rilevazione: Il limite di rilevazione inferiore è definito come il valore medio ottenuto testando un campione negativo (analyte-free) più un valore pari a tre volte la deviazione standard, ed è il più piccolo titolo anticorpale determinabile. Il limite di rilevazione di questo test ELISA è 0,59 UI/ml.



Specificità analitica: Questo test ELISA determina specificatamente autoanticorpi umani diretti contro l'acido glutammico decarbossilasi, isoforma GAD65.

Campioni di siero di 176 pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES; n = 9), artrite reumatoide (RA; n = 10), malattia di Graves (n = 86), tiroidite di Hashimoto (n = 10) e diabete mellito di tipo 2 (n = 61) (origine: Europa) non hanno dimostrato alcuna cross-reattività.

Cinque campioni di pazienti con LES (n = 1), malattia di Graves (n = 2), tiroidite di Hashimoto (n = 1) e diabete mellito di tipo 2 (n = 1) (origine: Europa) hanno dimostrato una concentrazione di anticorpi anti-GAD superiore a 10 UI/ml.

Interferenza: Sieri emolitici, lipemici ed itterici con una concentrazione fino a, rispettivamente 5 mg/ml di emoglobina, 3000 mg/ml di intralipidi ed a 20 mg/ml di bilirubina non hanno mostrato alcun effetto sui risultati analitici di questo test.

Riproducibilità: La riproducibilità del test è stata analizzata determinando il coefficiente di variazione intra- ed inter-saggio (CV) utilizzando 2 sieri i cui valori si posizionano su differenti punti della curva di calibrazione. I CV intra-saggio sono stati calcolati sulla base di 25 determinazioni ed i CV inter-saggio su 20 determinazioni.

Variazione Intra-Saggio, n = 25		
Siero	Media (IU/ml)	CV (%)
1	20,0	8,5
2	97,2	7,3

Variazione Inter-Saggio, n = 20		
Siero	Media (IU/ml)	CV (%)
1	21,0	5,2
2	96,9	5,7

Paragone con altri metodi: Le concentrazioni di anticorpi anti-GAD di 215 campioni di siero (origine: Germania) sono stati analizzati mediante questo test ELISA ed un test RIA (EUROIMMUN AG) come metodo di riferimento. Dei 215 sieri analizzati, 131 sono risultati positivi sieri e 77 sieri sono risultati negativi in entrambi i test. Cinque dei sette sieri rimanenti sono risultati positivi solamente con il test RIA e 2 sieri solamente con il test ELISA.

Il test ha dimostrato una sensibilità pari a 96% con una specificità del 98%.

Sensibilità e specificità clinica: Sono stati analizzati 140 sieri (50 prelevati da pazienti recentemente diagnosticati con diabete di tipo 1, e 90 da donatori sani; origine: USA) durante il programma IASP (Islet Antibody Standardization Program, 2005). I risultati ottenuti hanno dimostrato una sensibilità del 82% ed una specificità del 99%.

Range di riferimento: Per determinare il range normale, sono stati studiati 300 sieri di donatori sani (origine: Europa): il 99% delle concentrazioni di anticorpi anti-GAD di tutti i sieri presentava un cut-off di 10 UI/ml.

Inoltre, sono stati analizzati 39 sieri di pazienti pre-caratterizzati con diabete mellito di tipo 1 (gruppo pazienti 1) e 74 sieri di pazienti con un sospetto di diabete mellito di tipo 1 (gruppo pazienti 2) (origine: Europa). Il 90% dei sieri dei pazienti del gruppo 1, ed il 50% dei sieri dei pazienti del gruppo 2 presentavano concentrazioni di anticorpi anti-GAD superiori a 10 UI/ml.

Spetta in ogni caso al laboratorio il compito di calcolare il proprio range di riferimento utilizzando campioni rappresentativi.

Significato clinico

Il diabete mellito di tipo 1 (T1DM, T1D) è una malattia autoimmune organo-specifica caratterizzata dalla distruzione selettiva delle cellule beta che producono insulina. L'insorgenza e il decorso delle reazioni autoimmuni dipendono entrambi da tre fattori interconnessi: la predisposizione genetica, un'immunoregolazione alterata e fattori esogeni.



In molti casi, il T1D è una **malattia poligenica** che colpisce gli individui predisposti geneticamente. Ad oggi sono stati descritti oltre 20 diversi loci genici associati al T1D. Il genotipo HLA è il fattore che più influenza l'insorgenza del diabete. Nel 50% dei casi, l'alta frequenza del T1D in una stessa famiglia è dovuta alla presenza di uno specifico allele HLA. Tra questi alleli, i genotipi HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 e HLA DR4-DQ8/DR4-DQ8 sono associati ad un rischio più alto di insorgenza del diabete. Circa la metà dei bambini che sviluppano il T1D prima dei cinque anni di età presentano uno di questi genotipi ad alto rischio. Circa il 20% dei figli di genitori che soffrono di T1D e che sono portatori di un genotipo ad alto rischio sviluppano gli autoanticorpi diretti contro le cellule insulari prima del secondo compleanno.

Il bersaglio principale (autoantigeni) delle reazioni autoimmuni specifiche di T1D sono le cellule insulari (parte endocrina del tessuto pancreatico, antigeni citoplasmatici delle cellule insulari), l'isoforma da 65 kDa dell'enzima acido glutammico decarbossilasi (GAD65), le proteine omologhe alla tirosina fosfatasi IA-2 (IA2 α e IA-2 β), il trasportatore dello zinco 8 (ZnT8), l'insulina e la proinsulina, che è il precursore dell'insulina. Il sistema immunitario può impiegare mesi oppure anni a reagire alle proteine delle cellule beta del corpo che producono insulina. Il livello dello zucchero nel sangue a digiuno aumenta solo quando è stato distrutto circa l'80% delle cellule beta. Per questo motivo, è indispensabile ricorrere allo screening esteso per identificare precocemente la distruzione delle cellule beta e per definire la prognosi.

Come fattori esogeni, si discute dell'importanza di alcune "sostanze nocive" (infezioni da virus, ad es. da coxsackievirus tipo B, rubivirus, echovirus, citomegalovirus, herpesvirus; sostanze chimiche dannose, ad es. le bafilomicine, alcuni alimenti, ecc.) e di alcuni fattori psicologici (stress, disturbi emotivi, ecc.). I bambini con predisposizione famigliare al T1D, ad esempio, sviluppano gli autoanticorpi anti cellule insulari nel 100% dei casi se è presente HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 e se hanno assunto latte vaccino o prodotti contenente glutine prima del quarto mese di vita.

Nel 1965, il WHO ha identificato diversi tipi di diabete, che sono stati poi modificati nel 1998. L'associazione tedesca diabetici (Deutsche Diabete Gesellschaft, DDG) ha accolto questa classifica nel 2000, modificandola e producendo delle linee guida ad essa associate nel 2009:

- Diabete mellito di tipo 1:
La distruzione delle cellule beta nelle isole di Langerhans provoca la carenza totale di insulina.
- Diabete mellito di tipo 2:
Questo tipo comprende la resistenza insulinica di origine genetica ed è associata a carenza di insulina e carenza totale di insulina negli stadi più avanzati della malattia. Questo tipo è spesso associato con altre sindromi metaboliche.
- Altri otto tipi di diabete specifici (ad esempio il diabete gestazionale)

Il numero di pazienti affetti da diabete mellito a livello mondiale è conosciuto con relativa accuratezza. Nel 2010, il 6,4% della popolazione mondiale (285 milioni di persone) soffriva di diabete, e di questi il 10% soffriva di T1D. L'incidenza (numero di nuovi casi) aumenta a livello mondiale, e si stima che si pari a 3% all'anno. Si stima che nel 2030, il 7,7% della popolazione mondiale (circa 640 milioni di persone) sarà affetto da diabete.

In Germania, circa 350.000 persone sono affette da T1D, e di questi circa 15.000 sono bambini e adolescenti sotto i 14 anni. In questo gruppo di età, si registrano da 2.100 a 2.300 nuovi casi all'anno. È probabile che circa 500.000 pazienti che sono considerati affetti dal diabete di tipo 2, siano in realtà affetti da T1D/LADA (diabete autoimmune latente dell'adulto). Senza ulteriori analisi, questi pazienti ricevono una diagnosi errata e, di conseguenza, una terapia inadeguata.

Le manifestazioni cliniche del diabete ad insorgenza in età adulta inizia con poliuria, polidipsia, nicturia, dimagrimento e affaticamento. La gravità dello squilibrio metabolico è caratterizzato da apparenti microangiopatie (aterosclerosi diabetica). Altre complicanze, tra cui poliendocrinopatia, neuropatia, retinopatia, glomerulosclerosi diabetica, gangrene e coma diabetico, sono causa di una ridotta aspettativa di vita.

Gli strumenti immunodiagnostici per la **diagnosi sierologica** del T1D si basano sulla determinazione degli autoanticorpi specifici. Nelle nuove manifestazioni di diabete, i risultati della determinazione degli autoanticorpi è un criterio fondamentale per differenziare il diabete di tipo 1 e le forme diabetiche non autoimmuni come il diabete di tipo 2. Gli autoanticorpi diretti contro le proteine delle cellule beta, i cosiddetti autoanticorpi diretti contro le cellule insulari, sono i migliori marker diagnostici per identificare un processo autoimmune iniziale o in corso, e per monitorare il decorso della malattia.



L'uso di test sierologici altamente specifici e sensibili, come ELISA (con antigeni proteici ricombinanti), RIA (test radioimmunologici con autoantigeni marcati con sostanze radioattive) e l'immunofluorescenza indiretta (BIOCHIP Mosaic® con cellule transfettate) consente di determinare i principali autoanticorpi, per la diagnosi del T1D. Si tratta degli autoanticorpi diretti contro:

- **GAD65** (acido glutammico decarbossilasi)

La frequenza nel T1D di nuova insorgenza si attesta tra il 70 e il 90%.

L'acido glutammico decarbossilasi da 65 kDa è sintetizzata soprattutto nelle cellule insulari del pancreas.

La prevalenza non dipende dall'età del paziente.

- **IA2** (tirosina fosfatasi IA-2)

La frequenza riscontrata è tra il 50 e il 70% nei bambini e negli adolescenti e tra il 30 e il 50% negli adulti.

L'antigene transmembrana IA2 da 105 kD specifico per le cellule insulari IA2 è l'antigene principale del T1D, assieme al GAD. La progressione della malattia si correla con il titolo.

La prevalenza non dipende dall'età del paziente.

- **ICA** (cellule insulari del pancreas, antigeni citoplasmatici delle cellule insulari)

La frequenza nel T1D di nuova insorgenza è pari all'80%.

Durante il decorso della malattia, il titolo diminuisce. Di conseguenza, le ICA si riscontrano solo nel 10% dei pazienti dopo circa 10 anni.

La prevalenza diminuisce man mano che aumenta la durata della malattia.

Nota:

Un'alta concentrazione di autoanticorpi anti GAD può essere considerata indice del síndrome della persona rigida (conosciuta in precedenza come síndrome dell'uomo rigido), una malattia che comporta il progressivo irrigidimento dei muscoli e un irrigidimento secondario di quasi tutte le estremità, con progressiva encefalomielite con rigidità (PER).

Il primo screening autoanticorpale in bambini, adolescenti e giovani adulti (fino ai 25 anni) per il T1D deve comprendere la ricerca di diversi autoanticorpi mediante ELISA, RIA o immunofluorescenza indiretta. Per valutare la reattività anticorpale, questi parametri devono essere monitorati a intervalli regolari (da 1 a 3 anni, a seconda dell'età e il rischio di sviluppare il diabete), soprattutto nei bambini e negli adolescenti, dato che la risposta degli autoanticorpi cambia più frequentemente e più rapidamente.

Dato che nel 90% dei casi di T1D possono essere determinati nel siero uno o diversi autoanticorpi associati con il diabete mellito ancora prima della manifestazione clinica, è possibile identificare precocemente gli individui con un maggiore rischio di sviluppare la malattia. Più precoce e più forte è la risposta autoimmune (numero di autoanticorpi anti cellule insulari, affinità autoanticorpale, titolo autoanticorpale), più alto è il rischio del diabete. Alti titoli autoanticorpali sono associati con l'evolversi del T1D. Una risposta immunitaria che si diffonde ad altri antigeni bersaglio può essere interpretata come indice di una distruzione autoimmune delle cellule beta qualitativamente modificata e più aggressiva. Più giovane è il paziente al momento di determinare gli autoanticorpi, maggiore è il rischio di sviluppare l'autoimmunità insulare. Di tutti i bambini che presentano autoanticorpi multipli nel primo anno di vita, il 50% sviluppa il T1D entro due anni.

Grazie alla rilevazione precoce e il monitoraggio della "fase prediabetica" mediante diagnostica sierologica, è possibile intervenire in tempo:

1. Profilassi primaria per la prevenzione dell'autoimmunità insulare nei bambini predisposti geneticamente
2. Profilassi secondaria per la prevenzione della manifestazione del diabete nei bambini e negli adulti con autoimmunità insulare
3. Profilassi terziaria per prevenire le complicanze tardive nei pazienti affetti da T1D

Le nuove **terapie** si basano su una strategia terapeutica volta a modulare il processo autoimmune, ottenendo una tolleranza a lungo termine degli antigeni delle cellule insulari, proteggendo le cellule beta dalla distruzione. Le terapie attualmente prescritte comprendono la soppressione immunitaria generale limitata nel tempo, compresa la soppressione dei linfociti T autoreattivi attivati (es. anticorpi anti-CD3), e immunomodulazione antigene-specifica mediante vaccinazione con autoantigene (ad es. insulina orale/intranasale).

**Nota:**

Un recente studio multicentro su quasi 30.000 casi (bambini, adolescenti e giovani adulti) effettuato in Germania e Austria, dimostra che i pazienti affetti da T1D soffrono spesso anche di altre malattie autoimmuni. Oltre al T1D, la tiroidite autoimmune si manifesta in circa il 20% dei pazienti, il morbo celiaco in circa l'11%, l'adrenalite autoimmune in circa il 10% e la gastrite autoimmune in circa il 6,5%. Tra 1 e 2% dei pazienti affetti da T1D soffrivano di tre o anche quattro di queste malattie autoimmuni.

Informazioni relative al brevetto

Sono applicabili il brevetto europeo 1448 993 B1, il brevetto cinese ZL02822274.1, il brevetto indiano 226484, il brevetto giapponese 5711449 e il brevetto USA 8,129,132 B1. Inoltre è applicabile anche il brevetto USA 6,682,906 B1 e 6,277,586 B1 (licenza concessa ad RSR).

Bibliografia

1. Achenbach T, Pan L, Ziegler AG. **Frühdiagnostik bei Typ-1-Diabetes**. Diabetologie (2008) 47-58.
2. Boerschmann H, Walter M, Achenbach P, Ziegler AG. **Survey of recent clinical trials of the prevention and immunointervention of type 1 diabetes mellitus**. [Article in German] Dtsch Med Wochenschr 135 (2010) 350-354.
3. Decochez K, Truyen I, van der Auwera B, Weets I, Vandemeulebroucke E, de Leeuw IH, Keymeulen B, Mathieu C, Rottiers R, Pipeleers DG, Gorus FK. **Combined positivity for HLA DQ2/DQ8 and IA-2 antibodies defines population at high risk of developing type 1 diabetes**. Diabetologia 48 (2005) 687-694.
4. EUROIMMUN AG. Stöcker W, Schlumberger W, Krüger C. **Alle Beiträge zum Thema Autoimmun-diagnostik**. In: Gressner A, Arndt T. (Hrsg.). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2012).
5. Julier C, Akolkar B, Concannon P, Morahan G, Nierras C, Pugliese A. **The Type I Diabetes Genetics Consortium 'Rapid Response' family-based candidate gene study: strategy, genes selection, and main outcome**. Genes Immun 10 (2009) 121-127.
6. Krüger* C, Stöcker* W, Schlosser M. (*EUROIMMUN AG). **Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies**. Antibodies 2 (2007) 369-378.
7. Rich SS, Akolkar B, Concannon P, Erlich H, Hilner JE, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Pociot F, Todd JA. **Current status and the future for the genetics of type I diabetes**. Genes Immun 10 (2009) 128-131.
8. Stöcker* W, Schaper J, Schuhose Ch, Vieregge P, Kömpf D, Scriba PC. (*EUROIMMUN AG). **Autoantibodies against cerebral gray matter in patients with insulin dependent diabetes mellitus**. Immunobiol 181 (1990) 223.
9. van Deutekom AW, Heine RJ, Simsek S. **The islet autoantibody titres: their clinical relevance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and the classification of diabetes mellitus**. Diabet Med 25 (2008) 117-125.
10. Vieregge P, Branczyk B, Barnett W, Stöcker* W, Soyka D, Kömpf D. (*EUROIMMUN AG). **Stiff-Man-Syndrom. Bericht über vier Fälle**. Nervenarzt 65 (1994) 712-717.
11. Warncke K, Fröhlich-Reiterer EE, Thon A, Hofer SE, Wiemann D, Holl RW. **Polyendocrinopathy in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes: a multicenter analysis of 28,671 patients from the German/Austrian DPV-Wiss database**. Diabetes Care 33 (2010) 2010-2012.
12. Yu L, Liu Y, Miao D, Wenzlau J, Davidson H, Hutton J, Eisenbarth GS. **Triple chimeric islet auto-antigen IA2-ZnT8WR to facilitate islet autoantibody determination**. J Immunol Methods 353 (2010) 20-23.





Schema di dispensazione per il test ELISA anti-GAD

Calibratori	Controlli	Campioni
-------------	-----------	----------

Calibratori 1 - 6	25 µl		
Controllo negativo		25 µl	
Controllo positivo		25 µl	
Campione siero			25 µl

Incubare per 1 ora a temperatura ambiente su di un agitatore automatico a 500 rpm

lavare 3x

GAD	100 µl
-----	--------

Incubare per 1 ora a temperatura ambiente su di un agitatore automatico a 500 rpm

lavare 3x

Coniugato enzimatico	100 µl
----------------------	--------

Incubare per 20 min a temperatura ambiente su di un agitatore automatico a 500 rpm

lavare 3x

Substrato	100 µl
-----------	--------

Incubare per 20 min a temperatura ambiente al buio

Soluzione di arresto	100 µl
----------------------	--------

Agitare delicatamente e leggere l'assorbanza a 450 nm e poi a 405 nm

Anti-THSD7A IFA

Istruzioni per il test in immunofluorescenza indiretta

CODICE NO.	ANTICORPI ANTI	SUBSTRATO	SPECIE	FORMATO VETRINI x POZZETTI
FA 1254-1003-51	THSD7A	cellule transfettate	EU 90	10 x 03 (030)
FA 1254-1005-51		cellule di controllo della		10 x 05 (050)
FA 1254-2005-51		trasfezione		20 x 05 (100)

Indicazione: Il test serve per la determinazione in vitro di tipo qualitativo o semiquantitativo degli anticorpi umani di classe immunoglobulinica IgG diretti contro THSD7A nei campioni dei pazienti a supporto della diagnosi della nefropatia membranosa primaria (pMN, anche conosciuta come glomerulonefrite membranosa primaria, pMGN).

Applicazione: In aggiunta agli anticorpi anti-PLA₂R, gli anticorpi anti-THSD7A rappresentano un ulteriore marker specifico per il chiarimento da un punto di vista sierologico di sospette pMN. La determinazione parallela di entrambi gli anticorpi aumenta il tasso di determinazione sierologica fino del 10% dei pazienti pMN sieronegativi per anti- PLA₂R che mostrano anticorpi diretti contro THSD7A. Esiste una connessione tra le pMN THSD7A-associate e la presenza di tumori maligni.

Principio del test: Le cellule esprimenti THSD7A vengono incubate con il campione diluito del paziente. Se la reazione è positiva, specifici anticorpi di classe IgA, IgG e IgM si legano agli antigeni. In un secondo passaggio, gli anticorpi legatisi reagiscono con anticorpi anti-immunoglobuline umane coniugati con FITC e vengono evidenziati tramite microscopio a fluorescenza.

Contenuto di una confezione da 50 determinazioni (ad es. FA 1254-1005-51):

Descrizione	Formato	Simbolo
1. Vetrini ciascuno contenente 5 x 2 BIOCHIP: il primo coattato con cellule transfettate con THSD7A, il secondo con cellule transfettate di controllo	10 vetrini	SLIDE
2. Anticorpi anti-IgG umane (capra) coniugati con FITC, soluzione pronta per l'uso	1 x 1,5 ml	CONJUGATE
3. Controllo positivo: autoanticorpi umani anti-THSD7A, soluzione pronta per l'uso	1 x 0,1 ml	POS CONTROL
4. Controllo negativo: autoanticorpi umani negativi, soluzione pronta per l'uso	1 x 0,1 ml	NEG CONTROL
5. Sale per PBS pH 7,2	2 confezioni	PBS
6. Tween 20	2 x 2,0 ml	TWEEN 20
7. Mezzo di montaggio, pronto per l'uso	1 x 3,0 ml	GLYCEROL
8. Vetrini copri oggetto (62 mm x 23 mm)	12 pezzi	COVERGLASS
9. Scheda tecnica (istruzioni per l'uso)	1 libretto	---
LOT Descrizione del lotto	CE	Temperatura di conservazione
IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Utilizzabile integro fino al

I singoli vetrini (ad es., EUROIMMUN codice no. FB 1254-1005-51) vengono forniti assieme ai vetrini copri oggetto. Un controllo negativo (ad es., EUROIMMUN codice no. CA 1000-0101) può eventualmente essere ordinato.

L'esecuzione del test necessita di supporti vetrosi per reagenti TRAY non compresi nel kit di analisi. Questi possono essere richiesti a EUROIMMUN:

- ZZ 9999-0110 Supporti vetrosi per vetrini contenenti fino a 10 pozzetti.

Conservazione e stabilità: I vetrini ed i reagenti devono essere conservati ad una temperatura tra +2°C e +8°C. Se non aperti, tutti i componenti del kit sono stabili fino alla data indicata.

Smaltimento rifiuti: I campioni dei pazienti, i controlli ed i vetrini devono essere trattati come materiale potenzialmente infetto. Tutti i reagenti devono essere smaltiti in conformità alle disposizioni di legge.

Gli aggiornamenti rispetto alla versione precedente sono contrassegnati in grigio.



Esecuzione del test (pozzetti 5 x 5 mm)

La tecnica **TITERPLANE** è stata sviluppata da EUROIMMUN al fine di standardizzare le analisi immunologiche: I campioni da testare, i controlli ed il coniugato vengono depositati nei pozzetti di un supporto vetroso per reagenti. I vetrini con i BIOCHIP vengono posizionati negli appositi spazi del supporto vetroso; in questo modo tutti i BIOCHIP sono in contatto con i reagenti e le singole reazioni possono iniziare simultaneamente. Posizione ed altezza delle gocce sono esattamente definite dalla geometria del sistema. Dato che i liquidi sono confinati in uno spazio chiuso, non è necessario l'impiego di una camera umida convenzionale. E' possibile incubare un numero illimitato di campioni uno accanto all'altro simultaneamente e nelle stesse condizioni.

Preparazione: La preparazione dei reagenti e del campione di siero o di plasma è descritta a **pagina 4** di questa scheda tecnica.

Deposizione: Depositare **30 µl del siero diluito** su ogni pozzetto del supporto vetroso; evitare la formazione di bolle d'aria. Trasferire tutti i campioni da testare prima di iniziare l'incubazione (fino ad un massimo di 200 pozzetti). Utilizzare la base in polistirolo come riferimento.

Incubazione: Iniziare le reazioni posando i vetrini negli appositi spazi del supporto vetroso. Accertarsi che ogni campione sia in contatto con il suo BIOCHIP e che non vi sia cross-contaminazione tra i vari pozzetti. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C).

Lavaggio: Sciacquare i vetrini direttamente con un beaker contenente il tampone e quindi immergerli per almeno **5 minuti** nell'apposita cuvette contenente PBS-Tween. Se disponibile agitare con un agitatore rotante. Lavare al massimo 16 vetrini, poi sostituire il PBS-Tween con nuovo buffer pulito.

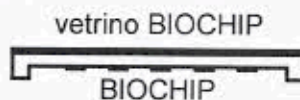
Deposizione: Aggiungere **25 µl di coniugato** ad ogni pozzetto di un supporto vetroso pulito. Riempire tutti i pozzetti prima di continuare l'incubazione. E' consigliabile utilizzare una pipetta multi-stepper. Miscelare il **coniugato** accuratamente prima dell'uso. Per risparmiare tempo, il coniugato può essere depositato nei pozzetti durante la prima incubazione in supporti vetrosi separati.

Incubazione: Estrarre un vetrino alla volta **dalla cuvette**. Entro 5 secondi asciugare con un pezzo di carta assorbente solo la parte posteriore ed i due bordi lunghi del vetrino e posizionare immediatamente il vetrino con i BIOCHIP negli appositi spazi del supporto vetroso. Non asciugare la superficie tra i BIOCHIP. Controllare l'avvenuto contatto tra i BIOCHIP ed il coniugato. Procedere allo stesso modo per gli altri vetrini. Da questo punto in poi evitare l'esposizione dei vetrini alla luce diretta. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C).

Lavaggio: Riempire la cuvette con PBS-Tween nuovo. Sciacquare i vetrini direttamente con un beaker contenente il tampone ed immergerli per almeno **5 minuti** nell'apposita cuvette contenente PBS-Tween. Se disponibile agitare con un agitatore rotante. Lavare al massimo 16 vetrini, poi sostituire il PBS-Tween con nuovo buffer pulito.

Montaggio: Porre il mezzo di montaggio sul vetrino copri oggetto – depositare una goccia di **max. 10 µl** di mezzo di montaggio in corrispondenza di **ciascun pozzetto**. Utilizzare il supporto di polistirolo per il montaggio. Estrarre un vetrino alla volta, asciugare il retro e i 4 bordi con carta assorbente. Adagiare delicatamente il vetrino con i BIOCHIP rivolti verso il vetrino copri oggetto. Controllare che quest'ultimo si incastri perfettamente con il vetrino. Correggere la posizione se necessario. Procedere con gli altri vetrini.

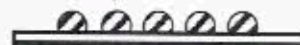
Valutazione: Leggere la fluorescenza al microscopio.
Raccomandazioni generali: obiettivo 20x (sezioni d'organo, cellule infettate e transfettate), 40x (substrati cellulari).
Filtro di eccitazione: 450-490 nm, separatore colorimetrico: 510 nm, filtro di bloccaggio: 515 nm.
Sorgente luminosa: lampada a vapori di mercurio, 100 W, EUROIMMUN LED, EUROStar Bluelight.

**Tecnica TITERPLANE**vaschetta porta
reagenti

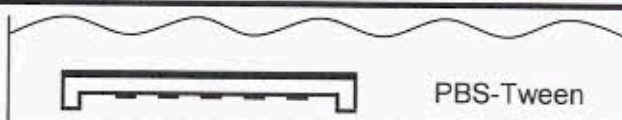
Deposizione: 30 µl per pozzetto



campioni diluiti



Incubare: 30 min

Lavaggio: 1 s risciacquo
5 min cuvetta

Deposizione: 25 µl per pozzetto



coniugato



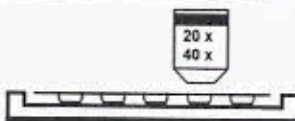
Incubare: 30 min

Lavaggio: 1 s risciacquo
5 min cuvetta

Montare: max. 10 µl per pozzetto

mezzo di montaggio
vetrino coprioggetto

Valutazione: microscopio a fluorescenza



Incubazione automatizzata: Il kit può essere incubato utilizzando strumenti automatizzati, ad es., IF Sprinter, Sprinter XL, EUROLabLiquidHandler o altri. L'incubazione e le condizioni di lavaggio programmate dovrebbero essere le stesse di quelle descritte nella procedura manuale. Le configurazioni del test per gli strumenti EUROIMMUN sono validate in combinazione con il kit. Qualunque altra combinazione deve essere validata dall'utilizzatore. Per i dettagli far riferimento al manuale dello strumento.



Preparazione e stabilità dei reagenti

Note: Dopo l'iniziale apertura, i reagenti sono stabili fino alla data di **scadenza se** con-servati ad una temperatura tra +2°C e +8°C e protetti da contaminanti, salvo indicazioni riportate qui di seguito.

- **Vetrini:** Pronti per l'uso. Rimuovere l'involucro protettivo solamente quando i vetrini hanno raggiunto la temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C; la condensa può danneggiare il substrato). Non toccare i BIOCHIP. Se la bustina è danneggiata, il vetrino non deve essere utilizzato per il test diagnostico.
- **Anticorpo secondario coniugato con FITC:** Pronto per l'uso. La soluzione deve essere miscelata accuratamente prima del suo primo utilizzo. Il coniugato è sensibile alla luce. Proteggere la soluzione dalla luce diretta ☀.
- **Sieri di controllo positivo e negativo:** Pronti per l'uso. Prima di utilizzare i sieri di controllo per la prima volta, miscelare la soluzione accuratamente.
- **PBS-Tween:** 1 confezione di "Sale per tampone fosfato" deve essere disciolta in 1 litro di acqua distillata (meglio se acqua per infusione, acqua ad injectabilia) e miscelata con 2 ml di Tween 20 (agitare per 20 minuti finché la soluzione non è omogenea). Il tampone PBS-Tween così preparato può essere conservato tra +2°C e +8°C generalmente per 1 settimana. Il tam-pone PBS-Tween non deve essere usato se la soluzione presenta torbidità o segni di conta-minazione.
- **Mezzo di montaggio:** Pronto per l'uso.
- **Supporti vetrosi per reagenti:** I pozzetti dei supporti vetrosi devono essere idrofili mentre l'area circostante idrofobica. Se necessario, lasciare in ammollo in Deconex 11 universale (2%) (EUROIMMUN codice no.: ZZ 9912-0101) per 12 ore. Successivamente sciacquare abbondantemente con acqua e asciugare. Per pulire: Frizionare i supporti vetrosi con Extran MA 01 5% (EUROIMMUN codice no.: ZZ 9911-0130) e sciacquare abbondantemente con acqua. Per disinfettare: Spruzzare abbondantemente i supporti vetrosi con Mikrozid AF (EUROIMMUN codice no.: ZZ 9921-0125), capovolgere i supporti e lasciare agire per 5 minuti. Successivamente, sciacquare abbondantemente con acqua e asciugare.

Avvertenze: I BIOCHIP coattati con i substrati antigenici sono stati trattati con un agente fissativo disinfettante. Mediante specifici test ELISA o test in Immunofluorescenza Indiretta si è dimostrata l'assenza di HBsAg e degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2, e anti-HCV nei sieri di controllo. **Tuttavia, tutti i componenti del kit devono essere trattati come materiale potenzialmente infetto.** Alcuni reagenti contengono **sodio azide** in concentrazione non dichiarata. Evitare il contatto con la pelle.

Preparazione e stabilità dei campioni

Campioni: Siero umano o EDTA, eparina o plasma citrato.

Stabilità: I campioni **dei pazienti** da testare possono essere conservati tra +2°C e +8°C fino a 14 giorni. I campioni diluiti devono essere testati entro la giornata.

Diluizione del campione raccomandata per la valutazione qualitativa: Il campione da testare viene diluito 1:10 in PBS-Tween. Per esempio, diluire 11,1 µl di campione in 100 µl di PBS-Tween e miscelare accuratamente, ad es., mediante vortex per 4 secondi.

Diluizione del campione raccomandata per la valutazione semiquantitativa: La diluizione dei campioni da testare viene eseguita utilizzando il tampone PBS-Tween. Aggiungere 100 µl di PBS-Tween a ciascuna provetta e miscelare con 11,1 µl della soluzione a concentrazione più alta, e miscelare mediante vortex per 2 secondi. EUROIMMUN raccomanda di incubare i campioni diluiti almeno 1:10.



Diluizione	Schema di diluizione	
1:10	100 µl PBS-Tween + 11,1 µl campione non diluito	
1:100	100 µl PBS-Tween + 11,1 µl campione diluito 1:10	
1:1000	100 µl PBS-Tween + 11,1 µl campione diluito 1:100	
⋮	⋮	

Interpretazione dei risultati

Pattern di fluorescenza (reazione positiva): Gli anticorpi diretti contro THSD7A reagiscono con le cellule transfettate del substrato. Essi producono una fluorescenza, diffusa, finemente granulare. La membrana cellulare appare orlata.

Le cellule esprimenti possono anche mostrare un pattern di fluorescenza aspecifica, più granulare, caratterizzata da particelle da finemente a grossolanamente granulare su un solo lato cellulare. Questa non dovrebbe essere valutata come una reazione positiva. Se in dubbio, confrontare il pattern di fluorescenza del controllo positivo.

Una fluorescenza a livello del nucleo cellulare o del citoplasma di tutte le cellule presenti nel vetrino indica la presenza di anticorpi anti-nucleo o anti-mitocondrio o diretti contro altri antigeni cellulari.

Se il controllo positivo non presenta una fluorescenza specifica oppure il controllo negativo dimostra una fluorescenza specifica, i risultati che si ottengono non devono essere presi in considerazione ed il test deve essere ripetuto.

Sul sito web di EUROIMMUN è possibile osservare i diversi pattern di fluorescenza (www.euroimmun.com).

Valutazione qualitativa raccomandata:

Reattività delle cellule transfettate (IgG)	Risultato
Nessuna reazione a 1:10	Negativo. Nessun anticorpo diretto contro THSD7A è stato ritrovato nel campione del paziente.
Reazione positiva a 1:10	Positivo. Indica nefropatia membranosa primaria.

Valutazione semiquantitativa raccomandata: Il titolo anticorpale è definito come il fattore di diluizione più basso con il quale è possibile evidenziare fluorescenza specifica. Questo deve essere confrontato con la reazione che si ottiene utilizzando un siero negativo diluito con lo stesso fattore di diluizione.

I titoli anticorpali possono essere determinati in accordo alla tabella riportata qui di seguito:

Fluorescenza a				Titolo anticorpale
1:10	1:100	1:1000	1:10000	
debole	negativa	negativa	negativa	1:10
moderata	negativa	negativa	negativa	1:32
intensa	debole	negativa	negativa	1:100
intensa	moderata	negativa	negativa	1:320
intensa	intensa	debole	negativa	1:1000
intensa	intensa	moderata	negativa	1:3200
intensa	intensa	intensa	debole	1:10000
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮



Limiti della procedura

1. La diagnosi non si dovrebbe basare su un singolo risultato del test. I sintomi clinici del paziente dovrebbero sempre essere presi in considerazione assieme ai risultati sierologici da parte del medico.
2. L'adeguamento di questo metodo per l'utilizzo con processori automatizzati di campioni e di strumentazioni che dispensano altri liquidi, totalmente o parzialmente, può dar luogo a differenze nei risultati rispetto a quelli ottenuti utilizzando la procedura manuale. Sta alla responsabilità di ciascun laboratorio validare i risultati ottenuti con la procedura automatizzata entro limiti accettabili.
3. Lo scorretto trattamento dei vetrini durante la fase di colorazione, specialmente lasciare asciugare i vetrini tra un passaggio e l'altro, può risultare in un pattern di apparenza "sbiadito, lavato via" e/o in una colorazione di fondo importante.
4. Le cuvette portavetrini utilizzate per il lavaggio dei vetrini dovrebbero essere pulite da eventuali residui. L'utilizzo di cuvette portavetrini contenenti residui può causare artefatti nella colorazione.
5. La sorgente luminosa, i filtri e il dispositivo ottico del microscopio a fluorescenza possono influenzare la sensibilità del metodo. Con l'utilizzo delle tradizionali lampade a mercurio, la prestazione del microscopio viene significativamente influenzata dalla corretta manutenzione, specialmente dal corretto allineamento della lampada e dalla sostituzione della lampada dopo il periodo di tempo raccomandato. I microscopi a fluorescenza di EUROIMMUN che hanno come sorgente di luce LED-BlueLight offrono molti vantaggi. Contattare EUROIMMUN per ulteriori dettagli.

Caratteristiche del test

Antigeni: Per la determinazione degli anticorpi diretti contro la proteina trombospodina di tipo 1 7A (THSD7A), si utilizzano come substrato standard cellule specificamente transfettate di EU 90.

Range di misurazione: Il fattore di diluizione di partenza è 1:10. I campioni possono successivamente essere diluiti con un fattore di diluizione 10. In questo modo la serie di diluizioni è 1:100, 1:1000, 1:10000, e così via. Non esiste alcun limite superiore per le diluizioni.

Riproducibilità: Le riproducibilità inter-lotto, intra-saggio ed inter-saggio sono assicurate.

Cross-reattività:

Anticorpi/ Substrato	Classe Ig	Specificità dei campioni	n	Prevalenza	
				Positivi	%
THSD7A (cellule transfettate) Siero/plasma	IgG	cANCA (anti-PR3 positivi)	11	0	0
		pANCA (anti-MPO positivi)	10	0	0
		anti-GBM positivi	9	0	0
		HBsAg positivi	10	0	0

Interferenza: Campioni emolitici, lipemici ed itterici non hanno dimostrato alcuna influenza sui risultati ottenuti.

Range di riferimento: Titolo 1:<10 (IgG)

Le seguenti prevalenze anticorpali sono state determinate utilizzando un pannello di 218 campioni proveniente da donatori sani (origine: Germania) e sono risultate pari a 0%.

**Metodo di confronto: specificità e sensibilità:**

Campioni testati / Test di riferimento:	n
1. Studio esterno: Si sono analizzati i campioni provenienti da pazienti con nefropatia membranosa (MN), confermata mediante biopsia. La caratterizzazione sierologica è stata effettuata utilizzando il test in house Anti-THSD7A Westernblot e Anti-THSD7A IFA (EUROIMMUN AG).*	1276
2. Studio esterno: Si sono analizzati n = 65 campioni di pazienti giapponesi con nefropatia membranosa idiopatica (iMN) o nefropatia membranosa secondaria (sMN). La caratterizzazione sierologica è stata effettuata utilizzando il test in house Anti-THSD7A Westernblot e Anti-THSD7A IFA (EUROIMMUN AG). Lo studio è stato eseguito presso Nagoya University Graduate School of Medicine, Giappone, dal Dr. Akiyama (Divisione di Nefrologia, Dipartimento di Medicina Interna).	65
Numero di campioni	1341

* Literature reference: Hoxha E, Beck LH Jr, Wiech T, Tomas NM, Probst C, Mindorf S, Meyer-Schwesinger C, Zahner G, Stahl PR, Schöpper R, Panzer U, Harendza S, Helmchen U, Salant DJ, Stahl RA. An Indirect Immunofluorescence Method Facilitates Detection of Thrombospondin Type 1 Domain-Containing 7A-Specific Antibodies in Membranous Nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2016 Jul 19.

n = 1341		Riferimento	
EUROIMMUN Anti-THSD7A IFA	positivi	positivi	negativi
	negativi	41	0
Specificità (%)		3	1297
Sensibilità (%)		100,0%	93,2%

Specificità e sensibilità clinica:

Substrato	Classe Ig	Pannelli di pazienti clinici (origine dei campioni)	n	Prevalenza	
				positivi	%
THSD7A	IgG	Pazienti con sindrome nefrotica (Belgio), di cui anti-PLA ₂ R-positivi: 5/12	12	1	8,3%
		Pazienti con nefropatia membranosa confermata mediante biopsia (USA), di cui anti-PLA ₂ R-positivi: 1/37	37	26	70,3%
		Pazienti con sindrome di Goodpasture (Cina), di cui anti-PLA ₂ R-positivi: 4/37	37	1	2,7%

Significato clinico

Assieme alla determinazione degli autoanticorpi diretti contro PLA₂R (recettore per la fosfolipasi A₂), la determinazione sierologica degli autoanticorpi diretti contro THSD7A (proteina trombospodina di tipo 1 7A) contribuisce significativamente alla diagnosi di nefropatia membranosa primaria (pMN), anche conosciuta come glomerulonefrite membranosa primaria (pMNG). Prima che gli autoanticorpi THSD7A e PLA₂R fossero identificati, pMN era chiamata "idiopatica" (nefropatia membranosa idiopatica, iMN) che significa "con causa sconosciuta".

MN è il problema renale più frequente negli adulti con la sindrome nefrotica. La pMN è una malattia infiammatoria cronica dei corpuscoli renali (glomeruli), che è accompagnata da una riduzione progressiva della funzione renale. Il meccanismo autoimmune sottostante si basa su una reazione degli autoanticorpi che sono diretti contro le glicoproteine transmembrana PLA₂R e THSD7A. Queste proteine transmembrana sono espresse sulla superficie dei podociti dei glomeruli umani. Come risultato del legame degli anticorpi, i podociti vengono danneggiati e la proteina entra nell'urina primaria (proteinuria).

Con l'aumento della proteinuria, il rischio a lungo termine di insufficienza renale con aumento di morbidità e mortalità diventa più elevato, specialmente in correlazione con complicazioni tromboemboliche e cardiovascolari.



La pMN può procedere in molti modi differenti. In circa un terzo dei casi la malattia guarisce spontaneamente. In un ulteriore terzo la malattia è ferma e nel terzo finale progredisce a insufficienza renale cronica. L'insufficienza renale acuta è rara. I pazienti con decorso cronici soffrono di una perdita completa della funzione renale (insufficienza renale terminale). Questo avviene in circa il 15% dei pazienti non trattati dopo 5 anni, nel 35% dopo 10 anni, e in circa il 40% dei pazienti dopo 15 anni. I pazienti colpiti hanno bisogno della dialisi e richiedono un trapianto di rene, che può solamente essere visto come terapia causale se combinato con una sufficiente immunosoppressione che comprende una riduzione degli autoanticorpi specifici.

La pMN è prevalente in tutti i gruppi etnici e generi con gli uomini Caucasici sopra ai 40 anni che sono quelli più frequentemente colpiti. Nelle giovani donne con sospetta pMN, si dovrebbe considerare la nefrite da lupus. Nei bambini la pMN si manifesta molto meno frequentemente, rappresenta il 2% a 3% di tutti i problemi renali dei bambini. La forma primaria di MN dovrebbe essere discriminata dalla forma secondaria, che è una malattia secondaria che si può manifestare come una conseguenza di infezioni, di cure farmacologiche o abuso o assunzione di tossine, nelle collagenosi e in altre malattie autoimmuni e nei tumori, e che presenta un decorso più blando con trattamento rispetto alla malattia sottostante. Il trattamento della pMN serve per migliorare la diagnosi, in particolare nei confronti della sindrome nefrotica e ipertonicità.

La diagnosi della pMN è fatta mediante il prelievo di tessuto renale e esame istologico o tramite microscopio elettronico del tessuto renale. Caratteristica è la deposizione di immunocomplessi sull'esterno della membrana basale glomerulare. La diagnosi sierologica della MNG primaria, tuttora, è più veloce e meno stressante per il paziente.

L'identificazione e la caratterizzazione del recettore per la fosfolipasi A₂ (tipo M) come antigene bersaglio con la prevalenza più alta degli autoanticorpi pMN contribuisce essenzialmente alla diagnostica non invasiva della pMN. Gli autoanticorpi di classe IgG diretti contro PLA₂R sono altamente specifici per la sierodiagnostica della pMN e sono determinabili nel 75% a 85% dei pazienti con pMN. THSD7A è stato identificato come il secondo antigene bersaglio. Gli autoanticorpi circolanti diretti contro THSD7A sono stati per la maggior parte determinati nei pazienti pMN negativi per anti PLA₂R. In casi rari, gli autoanticorpi diretti contro PLA₂R e THSD7A possono anche manifestarsi in parallelo. Dati sulla prevalenza degli autoanticorpi THSD7A variano in pannelli differenti di campioni con pMN, da 2,5% fino al 14%.

Con IFA e ELISA si hanno a disposizione due diversi metodi per la determinazione degli autoanticorpi diretti contro PLA₂R. Nel test Anti-Recettore della fosfolipasi A₂ (PLA₂R) IFA, si utilizza come substrato standard le cellule transfettate. Il substrato del test Anti-PLA₂R ELISA (IgG) è rappresentato dal recettore, espresso e purificato nelle cellule umane. L'IFA permette la determinazione qualitativa a semiquantitativa degli autoanticorpi diretti contro PLA₂R, mentre il test ELISA ne permette una quantificazione affidabile.

Il successo delle misure terapeutiche può essere stimato attraverso il titolo degli anticorpi anti PLA₂R. Un risultato sierologico con aumento, diminuzione o scomparsa del titolo precede un cambiamento dello stato clinico. Di conseguenza, la determinazione del titolo ha un elevato valore predittivo nei confronti della remissione clinica o della ricaduta, e per la valutazione del rischio della ricomparsa della pMN dopo il trapianto renale con progressiva perdita della funzione renale del rene trapiantato.

Il test IFA Anti-THSD7A rappresenta un supplemento ideale al test IFA Anti-Recettore della fosfolipasi A₂ per la comprensione sierologica nei casi sospetti di pMN. La determinazione parallela o a due stadi di THSD7A e PLA₂R aumenta il tasso di determinazione sierologica nei pazienti PLA₂R-negativi. Inoltre, la determinazione degli autoanticorpi diretti contro THSD7A di classe IgG si presta per la differenziazione tra MN primaria e secondaria, poiché gli autoanticorpi THSD7A sono specifici per pMN. Gli studi attuali suggeriscono che potrebbe esserci una relazione tra pMN THSD7A-positive e la presenza di tumori maligni.



Bibliografia

- Chen A, Frank R, Vento S, Crosby V, Chandra M, Gauthier B, Valderrama E, Trachtman H. **Idiopathic membranous nephropathy in pediatric patients: presentation, response to therapy, and long-term outcome.** BMC Nephrol 8 (2007) 11.
- Debiec H, Martin L, Jouanneau C, Dautin G, Mesnard L, Rondeau E, Mousson C, Ronco P. **Autoantibodies Specific for the Phospholipase A2 receptor in Recurrent and De Novo Membranous Nephropathy.** Am J Transplant 11 (2011) 2144-2152.
- EUROIMMUN AG. Stöcker W, Schlumberger W, Krüger C. **All entries on autoimmune diagnostics.** In: Gressner A, Arndt T (Eds.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2nd edition. Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2012).
- Gunnarsson I, Schlumberger* W, Rönnelid J. (*EUROIMMUN AG). **Antibodies to M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) and membranous lupus nephritis.** Am J Kidney Dis 59 (2012) 582-589.
- Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Fechner* K, Helmchen U, Stahl RAK. (*EUROIMMUN AG). **An immunofluorescence test for phospholipase-A2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis.** Nephrol Dial Transplant 26 (2011) 2526-2532.
- Hoxha E, Thiele I, Zahner G, Panzer U, Harendza S, Stahl RAK. **Phospholipase A2 Receptor Autoantibodies and Clinical Outcome in Patients with Primary Membranous Nephropathy.** J Am Soc Nephrol 25(6) (2014) 1357-1366.
- Hoxha E, Wiech T, Stahl PR, Zahner G, Tomas NM, Meyer-Schwesinger C, Wenzel U, Janneck M, Steinmetz OM, Panzer U, Harendza S, Stahl RAK. **A mechanism for cancer-associated membranous nephropathy.** N Engl J Med 374 (2016) 1995-1996.
- Hoxha E, Beck LH Jr., Wiech T, Tomas NM, Probst* C, Mindorf* S, Meyer-Schwesinger C, Zahner G, Stahl PR, Schöpper R, Panzer U, Harendza S, Helmchen U, Salant DJ, Stahl RAK (*EUROIMMUN AG). **An indirect immunofluorescence method facilitates detection of thrombospondin type 1 domain-containing 7A-specific antibodies in membranous nephropathy.** J Am Soc Nephrol 28 (2016) pii: ASN.2016010050.
- Larsen CP, Cossey LN, Beck LH. **THSD7A staining of membranous glomerulopathy in clinical practice reveals cases with dual autoantibody positivity.** Modern Pathology 29 (2016) 421-426.
- Seitz-Polski B, Payré C, Ambrosetti D, Albano L, Cassuto-Viguier E, Berguignat M, Jeribi A, Thouret MC, Bernard G, Benzaken S, Lambeau G, Esnault VLM. **Prediction of membranous nephropathy recurrence after transplantation by monitoring of anti-PLA2R1 (M-type phospholipase A2 receptor) autoantibodies: a case series of 15 patients.** Nephrol Dial Transplant 29 (2014) 2334-2342.
- Stahl RAK, Hoxha E, Fechner* K. (*EUROIMMUN AG). **PLA2R autoantibodies and recurrent membranous nephropathy after transplantation.** N Engl J Med 29 (2010) 496-498.
- Tomas NM, Beck LH Jr, Meyer-Schwesinger C, Seitz-Polski B, Ma H, Zahner G, Dolla G, Hoxha E, Helmchen U, Dabert-Gay AS, Debayle D, Merchant M, Klein J, Salant DJ, Stahl RAK, Lambeau G. **Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in Idiopathic Membranous Nephropathy.** N Engl J Med 371 (2014) 2277-2287.
- Tomas NM, Hoxha E, Reinicke AT, Fester L, Helmchen U, Gerth J, Bachmann F, Budde K, Koch-Nolte F, Zahner G, Rune G, Lambeau G, Meyer-Schwesinger C, Stahl RAK. **Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy.** J Clin Invest 126 (2016) 2519-2532.





Anti-IA2 ELISA Scheda tecnica

CODICE NO.	ANTICORPI ANTI	CLASSE IG	SUBSTRATO	FORMATO
EA 1023-9601 G	Tirosina fosfatasi (IA2)	IgG	Ag coattati nei pozzetti della micropiastra	96 x 01 (96)

Indicazioni: Il test kit ELISA è un saggio quantitativo in vitro per la determinazione nel siero o nel plasma di autoanticorpi umani diretti contro la tirosina fosfatasi (IA2), per la diagnosi del diabete mellito di tipo 1 (diabete mellito insulino-dipendente, IDDM).

Applicazione: Gli autoanticorpi diretti contro l'antigene 2 associato all'insulinoma (IA2) sono rilevabili nel 50% a 80% dei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1 di nuova insorgenza. Nelle persone che non soffrono di diabete, hanno un alto valore predittivo rispetto al rischio individuale di sviluppare il diabete di tipo 1. La prevalenza degli anticorpi anti-IA2 è associata fortemente con l'età del paziente: si riduce con l'aumentare dell'età. Nei bambini sani, gli autoanticorpi presentano un'alta sensibilità diagnostica rispetto ad una rapida evoluzione verso la forma manifesta del diabete mellito di tipo 1.

Principio del test: Il kit contiene una micropiastra con strip dotate ciascuna di 8 pozzetti frazionabili coattati con l'antigene IA2. Nella prima reazione, i campioni vengono incubati nei pozzetti. Nel caso di campioni positivi, anticorpi specifici si legheranno all'antigene IA2. Questi anticorpi specifici agiscono in modo bivalente formando un ponte tra la IA2, coattata al pozzetto, e la IA2 biotinilata che viene aggiunta eseguendo una seconda incubazione. Per evidenziare la IA2 biotinilata, legatasi agli anticorpi, si esegue una terza incubazione utilizzando un enzima coniugato con l'avidina (coniugato enzimatico), in grado di promuovere una reazione colorimetrica. L'intensità della colorazione registrata è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi anti-IA2 presenti nel campione testato.

Contenuto del kit:

Componente	Colore	Formato	Simbolo
1. Pozzetti in micro piastra coattati con gli antigeni 12 strip ognuna con 8 pozzetti frazionabili contenuti in un supporto, pronti per l'uso	---	12 x 8	STRIPS
2. Calibratori 1 a 6 4000 / 400 / 250 / 75 / 20 / 10 UI/ml (IgG, umane), pronti per l'uso	Incolore	6 x 0,7 ml	CAL 1 - CAL 6
3. Controllo negativo , 0 UI/ml (IgG, umane), pronto per l'uso	Incolore	1 x 0,7 ml	NEG CONTROL
4. Controllo positivo , (IgG, umane), pronto per l'uso	Incolore	1 x 0,7 ml	POS CONTROL
5. Tampone di diluizione campione , pronto per l'uso	Rosso	1 x 4,0 ml	SAMPLE BUFFER
6. IA2 , IA2 coniugata con biotina, liofilizzata	Incolore	3 x 4,5 ml	IA2
7. Tampone per IA2 , pronto per l'uso	Blu	2 x 15 ml	IA2 BUFFER
8. Coniugato enzimatico avidina coniugata con la perossidasi, concentrato 20x	Incolore	1 x 0,7 ml	CONJUGATE 20x
9. Tampone per il coniugato , pronto per l'uso	Incolore	1 x 15 ml	CONJ BUFFER
10. Tampone di lavaggio , concentrato 10x	Incolore	1 x 125 ml	WASH BUFFER 10x
11. Soluzione cromogeno/substrato TMB/H ₂ O ₂ , pronta per l'uso	Incolore	1 x 15 ml	SUBSTRATE
12. Soluzione di arresto acido solforico 0,25 M, pronta per l'uso	Incolore	1 x 12 ml	STOP SOLUTION
13. Foglio plastificato	---	3	FOIL
14. Certificato del controllo di qualità	---	1	
15. Scheda tecnica (istruzione per l'uso)	---	1	
LOT Descrizione del lotto	 		
IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro			
		Temperatura di conservazione	
		Utilizzabile integro fino al	

Gli aggiornamenti rispetto alla versione precedente sono contrassegnati in grigio.



Preparazione e stabilità dei reagenti

Nota: Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C) circa 30 minuti prima dell'uso. Una volta aperti, i reagenti si mantengono stabili fino alla data di scadenza indicata, se conservati a una temperatura tra +2°C e +8°C e protetti da contaminazioni, salvo diverse indicazioni riportate di seguito.

- **Pozzetti coattati:** Aprire l'involucro protettivo richiudibile in corrispondenza degli incavi posizionati sopra la chiusura a pressione. Aprire l'involucro solo quando le strip hanno raggiunto la temperatura ambiente per evitare la formazione di condensa sulla superficie dei pozzetti. Riposizionare immediatamente i pozzetti non utilizzati nell'involucro protettivo e sigillarlo utilizzando la chiusura a pressione (non rimuovere il sacchetto deumidificatore). Una volta aperto l'involucro, i pozzetti coattati con l'antigene possono essere conservati in un luogo asciutto ad una temperatura tra +2°C e +8°C per 4 mesi.
- **Calibratori e controlli:** Pronti per l'uso. Le soluzioni devono essere miscelate con cura prima dell'utilizzo.
- **Tampone diluizione per i campioni:** pronto per l'uso.
- **IA2:** Liofilizzato. Ricostituire i contenuti di una fiala con 4,5 ml di tampone per IA2. Qualora sia necessario utilizzare più di una fiala di IA2, unire il contenuto ricostituito di ogni fiala in un unico recipiente e miscelare accuratamente prima dell'utilizzo. Evitare la formazione di bolle d'aria. La soluzione di IA2 è stabile per un massimo di 1 giorno alla temperatura tra +2°C e +8°C.
- **Coniugato enzimatico:** Il coniugato enzimatico è concentrato 20x. La quantità richiesta deve essere prelevata dalla fiala utilizzando una pipetta pulita e diluita 1:20 con il tampone del coniugato (1 parte di reagente + 19 parti di tampone di coniugato). Miscelare accuratamente prima dell'uso. Il coniugato enzimatico diluito è stabile per un massimo di 20 settimane tra +2°C e +8°C.
- **Tampone di lavaggio:** Il tampone di lavaggio è concentrato 10x. Se nel tampone concentrato si dovessero formare dei cristalli, riscaldarlo a +37°C e miscelare con cura prima di diluirlo. La quantità richiesta deve essere prelevata dall'apposito flaconcino usando puntali puliti e diluita con acqua deionizzata o distillata (1 parte di reagente + 9 parti di acqua distillata).
Ad esempio: Per 1 strip, diluire 5 ml di tampone concentrato con 45 ml di acqua.
Il tampone correttamente diluito rimane stabile per 4 settimane se conservato tra +2°C e +8°C e correttamente utilizzato.
- **Soluzione cromogeno/substrato:** Pronta per l'uso. Chiudere il flaconcino immediatamente dopo l'uso, poiché il contenuto è sensibile alla luce ☀. La soluzione cromogeno/substrato deve essere incolore. Non utilizzare la soluzione se presenta una colorazione blu.
- **Soluzione d'arresto:** Pronta per l'uso.

Conservazione e stabilità: Il kit test deve essere conservato a una temperatura compresa tra +2°C e +8°C. Non congelare. Se mantenuti integri, tutti i componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata.

Smaltimento dei residui: I campioni del paziente, i calibratori, i controlli e le strip incubate devono essere trattati come rifiuti con rischio infettivo. Tutti i reagenti devono essere smaltiti in base alla normativa locale vigente.

Avvertenza: I calibratori ed i controlli di origine umana utilizzati sono risultati negativi per HBsAg e per gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1 ed anti-HIV-2. Nonostante ciò, i materiali devono essere gestiti come potenzialmente infettivi e maneggiati con cura. Alcuni reagenti contengono sodio azide in una concentrazione inferiore alla soglia dichiarabile. Evitare il contatto con la pelle.

Preparazione e stabilità dei campioni

Campioni: Siero umano, plasma EDTA, plasma eparinato o plasma citrato.

Stabilità: I campioni dei pazienti da testare possono essere conservati tra +2°C e +8°C fino a 14 giorni. Ripetuti congelamenti e scongelamenti sono da evitare.



Esecuzione del test

Per **analisi quantitative** incubare i **calibratori da 1 a 6** assieme al controllo negativo, al controllo positivo ed ai campioni **non diluiti** da testare.

Incubazione del campione:

(1° passaggio)

Trasferire **50 µl** dei calibratori, dei controlli positivo e negativo e dei campioni nei singoli pozzetti seguendo il protocollo di lavoro. Aggiungere ad ogni pozzetto usato **25 µl** di tampone di diluizione campione. Coprire la piastra ed agitare per **5 secondi** (su **agitatore per micropiastra a 500 rpm**).
Incubare per **16 a 20 ore a +4°C- +8°C**.

Lavaggio:

Manuale: Rimuovere il foglio plastificato e svuotare i pozzetti e successivamente lavare per 3 volte utilizzando 350 µl di tampone di lavaggio **correttamente** diluito per ciascun pozzetto.

Automatico: Rimuovere il foglio protettivo e lavare i pozzetti per 3 volte con 450 µl di tampone di lavaggio **correttamente** diluito (impostazione del programma: **es. TECAN Columbus Washer "Overflow Mode"**).

Lasciare il tampone di lavaggio in ciascun pozzetto per **30 a 60 secondi** per ciclo di lavaggio, quindi svuotare i pozzetti. Dopo il lavaggio (manuale e automatico), **capovolgere la piastra e rimuovere tutto il tampone di lavaggio residuo battendo vigorosamente su della carta assorbente**.

Le posizioni libere della strip devono essere riempite con pozzetti **vuoti** dello stesso formato di quelli utilizzati per il parametro da analizzare.

Incubazione della IA2 biotinilata:

(2° passaggio)

Depositare **100 µl** di IA2 biotinilata **fredda** in ciascun pozzetto della micropiastra. Coprire la piastra ed incubare per **1 ora a +4°C a +8°C**.

Lavaggio:

Svuotare i pozzetti. Lavare come descritto sopra.

Incubazione del coniugato:

(3° passaggio)

Depositare **100 µl** del coniugato enzimatico (avidina coniugata con la perossidasi) in ciascun pozzetto della micropiastra. Coprire la piastra.

Incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C) su di un **agitatore per micropiastra a 500 rpm**.

Lavaggio:

Svuotare i pozzetti. Lavare come descritto sopra.

Nota: I residui di liquido (>10 µl) che rimangono all'interno di ogni pozzetto dopo il lavaggio, possono interferire con il substrato e produrre valori di assorbanza falsamente bassi. Lavaggi insufficienti (es. meno di 3 cicli di lavaggio, volumi troppo piccoli di tampone di lavaggio o tempi di reazione troppo brevi) possono produrre valori di assorbanza falsamente alti.

Incubazione del substrato:

(4° passaggio)

Depositare **100 µl** della soluzione cromogeno/substrato in ciascun pozzetto della micropiastra.

Incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C), proteggere la piastra dalla luce diretta.

Arresto:

Depositare **100 µl** della soluzione di arresto in ciascun pozzetto della micropiastra nello stesso ordine ed alla stessa velocità con cui si è aggiunta la soluzione cromogeno/substrato.

Misurazione:

La **misura fotometrica** dell'intensità di colore deve essere effettuata ad una **lunghezza d'onda di 450 nm e poi a 405 nm** e ad una lunghezza d'onda di riferimento tra 620 nm e 650 nm **entro 5 minuti dall'aggiunta della soluzione d'arresto**. Prima di effettuare la misurazione, agitare delicatamente la piastra per assicurare una distribuzione omogenea della soluzione.



Protocollo di lavoro

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C 1	P 1	P 9	P 17	P 25							
B	C 2	P 2	P 10	P 18								
C	C 3	P 3	P 11	P 19								
D	C 4	P 4	P 12	P 20								
E	C 5	P 5	P 13	P 21								
F	C 6	P 6	P 14	P 22								
G	neg.	P 7	P 15	P 23								
H	pos.	P 8	P 16	P 24								

Il protocollo riportato sopra per le strip da 1 a 5 è un esempio di **analisi quantitativa** di **25** campioni dei pazienti (da P 1 a P 25).

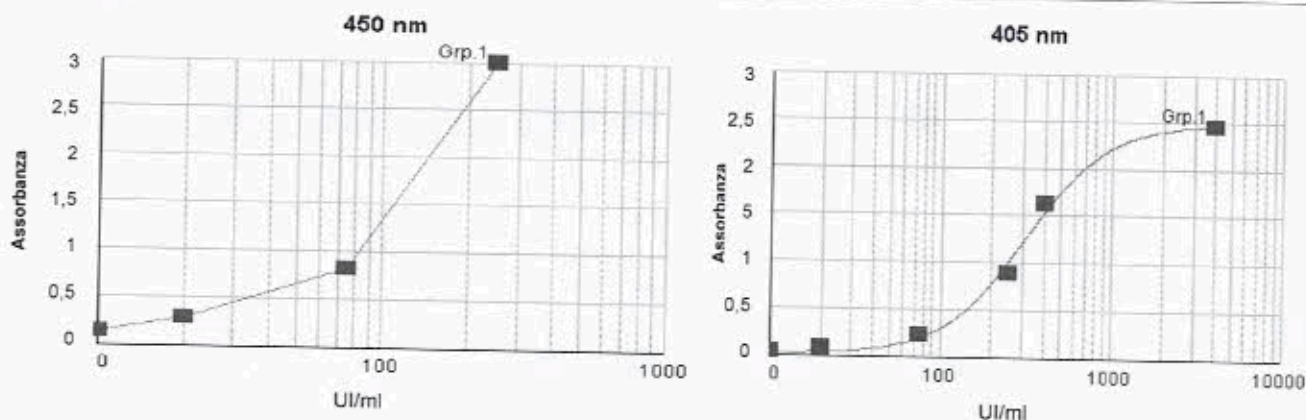
I calibratori (da C 1 a C 6), il controllo positivo (pos.) e negativo (neg.) ed i campioni (P) sono stati incubati in singolo. L'affidabilità del test ELISA può essere migliorata duplicando le determinazioni per ciascun campione.

Sia il controllo positivo che negativo servono da controlli interni per valutare l'affidabilità del test; il loro valore deve essere, quindi, analizzato ad ogni esecuzione del test.

Calcolo dei risultati

Quantitativo: Le curve di calibrazione utilizzate per determinare la concentrazione degli anticorpi anti-IA2, presenti nel siero, sono ottenute riportando i valori di assorbanza registrati per i **calibratori 3 a 6 (450 nm) o per i calibratori 1-6 (405 nm)** (scala lineare, asse-y) contro le corrispondenti concentrazioni (scala logaritmica, asse-x). Per il calcolo automatico, mediante software, della curva di calibrazione a 405 nm, è necessario utilizzare il metodo di valutazione LogitLog. Metodi alternativi possono essere il tracciato Point-to-Point ed il modello logistico a 4 parametri. Per il calcolo della curva ottenuta a 450 nm bisogna utilizzare il tracciato Point-to-Point. **Concentrazioni basse (<75 UI/ml, calibratore 4)** devono essere lette sulla **curva di calibrazione ottenuta a 450 nm** e **concentrazioni alte (>75 UI/ml)** devono essere lette sulla **curva ottenuta a 405 nm**. I grafici riportati qui di seguito sono un esempio di tipiche curve di calibrazione. Non **usare** queste curve per la determinazione della concentrazione degli anticorpi anti-IA2 nei sieri dei pazienti.

Calibratore / controllo	Assorbanza a 450 nm	Assorbanza a 405 nm
Calibratore 1	>4,00	2,45
Calibratore 2	>4,00	1,62
Calibratore 3	3,00	0,89
Calibratore 4	0,82	0,24
Calibratore 5	0,29	0,09
Calibratore 6	0,15	0,05
Controllo negativo	0,09	0,03



Se l'assorbanza di un campione si trova al di sotto del valore del calibratore 6 (10 UI/ml), il risultato deve essere indicato come "<10 UI/ml". Se l'assorbanza di un campione si trova al di sopra del valore del calibratore 1 (4000 UI/ml), il risultato deve essere indicato come ">4000 UI/ml". Si consiglia di testare il campione di nuovo in una nuova seduta ad una diluizione, ad esempio, di 1:20 in un siero negativo per anti-IA2. Il risultato, espresso in UI/ml ottenuto dalla curva di calibrazione per questo siero, deve essere moltiplicato per un fattore 20.

Il limite superiore dei valori normali (**cut-off**) raccomandato da EUROIMMUN è di **10 Unità Internazionali per millilitro (UI/ml)**. EUROIMMUN raccomanda di interpretare i risultati come indicato qui di seguito:

<10 UI/ml: negativo
≥10 UI/ml: positivo

Per le determinazioni in doppio, si dovrebbe prendere la media dei due valori. Se i due valori si discostano sostanzialmente l'uno dall'altro, EUROIMMUN consiglia di **ripetere** il test dei campioni.

Per effettuare una diagnosi, è importante considerare, oltre ai risultati sierologici, anche il quadro clinico del paziente.

Caratteristiche del test

Calibrazione: La calibrazione è stata eseguita in Unità Internazionali (UI) utilizzando il primo reagente di riferimento WHO per anticorpi diretti contro le cellule delle isole pancreatiche (WHO, 1999, reagente 97/550, National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, England). Il reagente di riferimento NIBSC 97/550 contiene per definizione 100 UI di anticorpi anti-IA2 per boccetta. 125 UI/ml corrispondono ad 1 UI/ml (unità relativa per millilitro) utilizzata nel kit EUROIMMUN RIA anti-IA2.

Per ciascun gruppo di test eseguito, le unità internazionali determinate per i controlli positivi e negativi devono rientrare all'interno dei limiti indicati per lo specifico lotto. Nel kit è contenuto un certificato del controllo di qualità dove sono riportati questi valori di riferimento. Se i valori specificati per i controlli non vengono raggiunti, i risultati del test possono essere inesatti e il test deve essere ripetuto.

Antigene: I singoli pozzetti della micropiastra sono stati coattati con la tirosina fosfatasi (IA2) ricombinante umana. Lo stesso antigene è stato utilizzato per la coniugazione con la biotina.

Limite di rilevazione: Il limite inferiore di rilevazione è definito come il valore medio ottenuto dalla somma di un campione senza analita e di un valore pari a tre volte la deviazione standard e rappresenta il più piccolo titolo anticorpale determinabile. Il limite di rilevazione del test anti-IA2 ELISA è di 1,04 UI/ml.



Specificità analitica: Questo test ELISA determina specificatamente autoanticorpi umani diretti contro la tirosina fosfatasi (IA2). Non si sono osservate cross-reattività con altri autoanticorpi. Il 5% (n = 20) dei campioni positivi per gli autoanticorpi contro la tireoglobulina e la perossidasi tiroidea, nonché il 5% (n = 20) dei campioni positivi per i fattori reumatoidi ha mostrato anticorpi anti-IA2. Questi campioni erano anche positivi nel corrispondente ELISA Anti-GAD.

Interferenza: Sieri emolitici ed itterici con una concentrazione fino a 5 mg/ml di emoglobina e 20 mg/ml di bilirubina non hanno mostrato alcun effetto sui risultati analitici di questo test. L'aggiunta di 1000 e 3000 mg/ml di Intralipid interferisce invece con i campioni lipemici.

Riproducibilità: La riproducibilità del test è stata analizzata determinando il coefficiente di variazione intra-saggio utilizzando 5 campioni ed inter-saggio (CV) utilizzando 2 campioni i cui valori si posizionano su differenti punti della curva di calibrazione. I CV intra-saggio sono stati calcolati sulla base di 25 determinazioni diverse ed i CV inter-saggio sono stati calcolati sulla base di 20 determinazioni diverse.

Variazione Intra-Saggio, n = 20		
Campione	Media (UI/ml)	CV (%)
1	6,1	2,1
2	12,0	3,1
3	41,0	1,3
4	80,0	1,6
5	296,0	2,1

Variazione Inter-Saggio, n = 20		
Campione	Media (UI/ml)	CV (%)
1	41,0	4,5
2	140,0	4,2

Confronto con altri metodi: Le concentrazioni di anticorpi anti-IA2, presenti in 122 sieri (origine: Germania), sono stati analizzati utilizzando questo test ELISA ed un test RIA (EUROIMMUN AG) come metodo di riferimento. Dei 122 sieri analizzati, 52 sono risultati positivi e 67 sono risultati negativi in entrambi i test; 3 sieri sono risultati positivi solamente con il test RIA. La sensibilità di questo test ELISA è stata del 95% con una specificità del 100% rispetto al test RIA.

Sensibilità e specificità clinica: Sono stati analizzati 140 sieri (50 prelevati da pazienti recentemente diagnosticati con diabete di tipo 1, e 90 da donatori sani; origine: USA) durante il programma IASP (Islet Antibody Standardization Program, 2015). I risultati ottenuti hanno dimostrato una sensibilità del 68% ed una specificità del 100%.

Range di riferimento: Per determinare il range di normalità, sono stati studiati 153 sieri di donatori sani. Il 100% delle concentrazioni di anticorpi anti-IA2 determinate è risultato al di sotto del valore di cut-off (10 UI/ml).

Spetta in ogni caso al laboratorio il compito di calcolare il proprio range di riferimento utilizzando campioni rappresentativi.

Significato clinico

Il diabete mellito di tipo 1 (T1DM, T1D) è una malattia autoimmune organo-specifica caratterizzata dalla distruzione selettiva delle cellule beta che producono insulina. L'insorgenza e il decorso delle reazioni autoimmuni dipendono entrambi da tre fattori interconnessi: la predisposizione genetica, una immuno-regolazione alterata e fattori esogeni.

In molti casi, la T1D è una malattia poligenica che colpisce gli individui predisposti geneticamente. Ad oggi sono stati descritte oltre 20 diversi loci genici associati al T1D. Il genotipo HLA è il fattore che più influenza l'insorgenza del diabete. Nel 50% dei casi, l'alta frequenza del T1D in una stessa famiglia è dovuta alla presenza di uno specifico allele HLA. Tra questi alleli, i genotipi HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 e HLA DR4-DQ8/DR4-DQ8 sono associati ad un rischio più alto di insorgenza del diabete. Circa la metà dei bambini che sviluppano il T1D prima dei cinque anni di età presentano uno di questi genotipi ad alto rischio. Circa il 20% dei figli di genitori che soffrono di T1D e che sono portatori di un genotipo ad alto rischio sviluppano gli autoanticorpi diretti contro le cellule delle isole prima dei due anni di vita.



I bersagli principali (autoantigeni) delle reazioni autoimmuni specifiche di T1D sono le cellule delle isole (parte endocrina del tessuto pancreatico, antigeni citoplasmatici delle cellule delle isole), l'isoforma da 65 kDa dell'enzima acido glutammico decarbossilasi (GAD65), le proteine omologhe alla tirosina fosfatasi IA-2 (IA2 α e IA-2 β), il trasportatore dello zinco 8 (ZnT8), l'insulina e la proinsulina, che è il precursore dell'insulina. Il sistema immunitario può impiegare mesi oppure anni a reagire alle proteine delle cellule beta del corpo che producono insulina. Il livello dello zucchero nel sangue a digiuno aumenta solo quando è stato distrutto circa l'80% delle cellule beta. Per questo motivo, è indispensabile ricorrere allo screening esteso per identificare precocemente la distruzione delle cellule beta e per definire la prognosi.

Come fattori esogeni, si discute sul ruolo di alcune "sostanze nocive" (infezioni da virus, ad es. da coxsackie virus tipo B, rosolia virus, echo virus, citomegalovirus, herpes virus; sostanze chimiche dannose, ad es. le bafilomicine, alcuni alimenti, ecc.) e di alcuni fattori psicologici (stress, disturbi emotivi, ecc.). I bambini con predisposizione familiare al T1D, ad esempio, sviluppano gli autoanticorpi anti cellule insulari nel 100% dei casi se è presente HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 e se hanno assunto latte vaccino o prodotti contenente glutine prima del quarto mese di vita.

Nel 1965, il WHO ha identificato diversi tipi di diabete, che sono stati poi modificati nel 1998. L'associazione tedesca diabetici (Deutsche Diabete Gesellschaft, DDG) ha accolto questa classifica nel 2000, modificandola e producendo delle linee guida ad essa associata nel 2009:

- Diabete mellito di tipo 1:
La distruzione delle cellule beta nelle isole di Langerhans provoca la carenza totale di insulina.
- Diabete mellito di tipo 2:
Questo tipo comprende la resistenza insulinica di origine genetica ed è associata a carenza di insulina e carenza totale di insulina negli stadi più avanzati della malattia. Questo tipo è spesso associato con altre sindromi metaboliche.
- Altri otto tipi di diabete specifici (ad esempio il diabete gestazionale)

Il numero di pazienti affetti da diabete mellito a livello mondiale è conosciuto con relativa accuratezza. Nel 2010, il 6,4% della popolazione mondiale (285 milioni di persone) soffriva di diabete, e di questi il 10% soffriva di T1D. L'incidenza (numero di nuovi casi) aumenta a livello mondiale, e si stima che si pari a 3% all'anno. Si stima che nel 2030, il 7,7% della popolazione mondiale (circa 640 milioni di persone) sarà affetto da diabete.

In Germania, circa 350.000 persone sono affette da T1D, e di questi circa 15.000 sono bambini e adolescenti sotto i 14 anni. In questo gruppo di età, si registrano da 2.100 a 2.300 nuovi casi all'anno. È probabile che circa 500.000 pazienti che sono considerati affetti dal diabete di tipo 2, siano in realtà affetti da T1D/LADA (diabete autoimmune latente dell'adulto). Senza ulteriori analisi, questi pazienti ricevono una diagnosi errata e, di conseguenza, una terapia inadeguata.

Le manifestazioni cliniche del diabete con insorgenza in età adulta inizia con poliuria, polidipsia, nicturia, dimagrimento e affaticamento. La gravità dello squilibrio metabolico è caratterizzata da apparenti microangiopatie (aterosclerosi diabetica). Altre complicanze, tra cui poliendocrinopatia, neuropatia, retinopatia, glomerulosclerosi diabetica, gangrene e coma diabetico, sono causa di una ridotta aspettativa di vita.

Gli strumenti immunodiagnostici per la **diagnosi sierologica** del T1D si basano sulla determinazione degli autoanticorpi specifici. Nelle nuove manifestazioni di diabete, i risultati della determinazione degli autoanticorpi è un criterio fondamentale per differenziare il diabete di tipo 1 e le forme diabetiche non autoimmuni come il diabete di tipo 2. Gli autoanticorpi diretti contro le proteine delle cellule beta, i cosiddetti autoanticorpi diretti contro le cellule insulari, sono i migliori marker diagnostici per identificare un processo autoimmune iniziale o in corso, e per monitorare il decorso della malattia.

L'uso di test sierologici altamente specifici e sensibili, come ELISA (con antigeni proteici ricombinanti), RIA (test radioimmunologici con autoantigeni marcati con sostanze radioattive) e l'immunofluorescenza indiretta (BIOCHIP Mosaic® con cellule transfettate) consente di determinare i principali autoanticorpi, per la diagnosi del T1D.



Si tratta degli autoanticorpi diretti contro:

- **GAD65** (acido glutammico decarbossilasi)

La frequenza nel T1D di nuova insorgenza si attesta tra il 70% e il 90%.

L'acido glutammico decarbossilasi da 65 kDa è **sintetizzato** soprattutto nelle cellule insulari del pancreas.

La prevalenza non dipende dall'età del paziente.

- **IA2** (tirosina fosfatasi IA-2)

La frequenza riscontrata è tra il 50 e il 70% in bambini e adolescenti e tra il 30 e il 50% negli adulti.

Assieme a GAD, l'antigene principale del T1D risulta essere l'antigene transmembrana IA2 da 105 kD specifico per le cellule delle isole. La progressione della malattia si correla con il titolo.

La prevalenza non dipende dall'età del paziente.

- **ICA** (cellule delle isole pancreatiche, antigeni citoplasmatici delle cellule delle isole)

La frequenza nel T1D di nuova insorgenza è pari all'80%.

Durante il decorso della malattia, il titolo diminuisce. Di conseguenza, le ICA si riscontrano solo nel 10% dei pazienti dopo circa 10 anni.

La prevalenza diminuisce man mano che aumenta la durata della malattia.

Nota:

Un'alta concentrazione di autoanticorpi anti GAD può essere considerata indice della **sindrome dell'uomo rigido** (stiff-man syndrome), una malattia che comporta il progressivo irrigidimento dei muscoli ed un irrigidimento secondario di quasi tutte le estremità, con progressiva encefalomielite con rigidità (PER).

Il primo screening autoanticorpale in bambini, adolescenti e giovani adulti (fino ai 25 anni) per il T1D deve comprendere la ricerca di diversi autoanticorpi mediante ELISA, RIA o immunofluorescenza indiretta. Per valutare la reattività anticorpale, questi parametri devono essere monitorati a intervalli regolari (da 1 a 3 anni, a seconda dell'età e il rischio di sviluppare il diabete), soprattutto nei bambini e negli adolescenti, dato che la risposta degli autoanticorpi cambia più frequentemente e più rapidamente.

Dato che nel 90% dei casi di T1D possono essere determinati nel siero uno o diversi autoanticorpi associati con il diabete mellito ancora prima della manifestazione clinica, è possibile identificare precocemente gli individui con un maggiore rischio di sviluppare la malattia. Più precoce e più forte è la risposta autoimmune (numero di autoanticorpi anti cellule insulari, affinità autoanticorpale, titolo autoanticorpale), più alto è il rischio del diabete. Alti titoli autoanticorpali sono associati con l'evolversi del T1D. Una risposta immunitaria che si diffonde ad altri antigeni bersaglio può essere interpretata come indice di una distruzione autoimmune delle cellule beta qualitativamente modificata e più aggressiva. Più giovane è il paziente al momento di determinare gli autoanticorpi, maggiore è il rischio di sviluppare l'autoimmunità insulare. Di tutti i bambini che presentano autoanticorpi multipli nel primo anno di vita, il 50% sviluppa il T1D entro due anni.

Grazie alla rilevazione precoce e il monitoraggio della "fase prediabetica" mediante diagnostica sierologica, è possibile **intervenire** in tempo:

1. Profilassi primaria per la prevenzione dell'autoimmunità insulare nei bambini predisposti geneticamente
2. Profilassi secondaria per la prevenzione della manifestazione del diabete nei bambini e negli adulti con autoimmunità insulare
3. Profilassi terziaria per prevenire le complicanze tardive nei pazienti affetti da T1D

Le nuove **terapie** si basano su una strategia terapeutica volta a modulare il processo autoimmune, ottenendo una tolleranza a lungo termine degli antigeni delle cellule insulari, proteggendo le cellule beta dalla distruzione. Le terapie attualmente prescritte comprendono la soppressione immunitaria generale limitata nel tempo, compresa la soppressione dei linfociti T autoreattivi attivati (es. anticorpi anti-CD3), e immunomodulazione antigene-specifica mediante vaccinazione con autoantigene (es. insulina orale/intranasale).

**Nota:**

Un recente studio **multicentrico** su quasi 30.000 casi (bambini, adolescenti e giovani adulti) effettuato in Germania e Austria, dimostra che i pazienti affetti da T1D soffrono spesso anche di altre malattie autoimmuni. Oltre al T1D, la tiroidite autoimmune si manifesta in circa il 20% dei pazienti, il morbo celiaco in circa l'11%, l'adrenalite autoimmune in circa il 10% e la gastrite autoimmune in circa il 6,5%. Tra 1% e 2% dei pazienti affetti da T1D soffrivano di tre o anche quattro di queste malattie autoimmuni.

Informazioni relative al brevetto

Sono applicabili i seguenti brevetti:

Brevetti RSR: brevetto europeo EP 1 448 993 B1, brevetto cinese ZL02822274.1, brevetto indiano 226484, brevetto giapponesi 5711449 and brevetto USA 8,129,132 B2.

Bibliografia

1. Achenbach T, Pan L, Ziegler AG. **Frühdiagnostik bei Typ-1-Diabetes**. Diabetologe (2008) 47-58.
2. Boerschmann H, Walter M, Achenbach P, Ziegler AG. **Survey of recent clinical trials of the prevention and immunointervention of type 1 diabetes mellitus**. [Article in German] Dtsch Med Wochenschr 135 (2010) 350-354.
3. Decochez K, Truyen I, van der Auwera B, Weets I, Vandemeulebroucke E, de Leeuw IH, Keymeulen B, Mathieu C, Rottiers R, Pipeleers DG, Gorus FK. **Combined positivity for HLA DQ2/DQ8 and IA-2 antibodies defines population at high risk of developing type 1 diabetes**. Diabetologia 48 (2005) 687-694.
4. EUROIMMUN AG. Stöcker W, Schlumberger W, Krüger C. **Alle Beiträge zum Thema Autoimmundiagnostik**. In: Gressner A, Arndt T. (Hrsg.). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2012).
5. Julier C, Akolkar B, Concannon P, Morahan G, Nierras C, Pugliese A. **The Type I Diabetes Genetics Consortium 'Rapid Response' family-based candidate gene study: strategy, genes selection, and main outcome**. Genes Immun 10 (2009) 121-127.
6. Krüger* C, Stöcker* W, Schlosser M. (*EUROIMMUN AG). **Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies**. Antibodies 2 (2007) 369-378.
7. Rich SS, Akolkar B, Concannon P, Erlich H, Hilner JE, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Pociot F, Todd JA. **Current status and the future for the genetics of type I diabetes**. Genes Immun 10 (2009) 128-131.
8. Stöcker* W, Schaper J, Schuhose Ch, Vieregge P, Kömpf D, Scriba PC. (*EUROIMMUN AG). **Autoantibodies against cerebral gray matter in patients with insulin dependent diabetes mellitus**. Immunobiol 181 (1990) 223.
9. van Deutekom AW, Heine RJ, Simsek S. **The islet autoantibody titres: their clinical relevance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and the classification of diabetes mellitus**. Diabet Med 25 (2008) 117-125.
10. Vieregge P, Branczyk B, Barnett W, Stöcker* W, Soyka D, Kömpf D. (*EUROIMMUN AG). **Stiff-Man-Syndrom. Bericht über vier Fälle**. Nervenarzt 65 (1994) 712-717.
11. Warncke K, Fröhlich-Reiterer EE, Thon A, Hofer SE, Wiemann D, Holl RW. **Polyendocrinopathy in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes: a multicenter analysis of 28,671 patients from the German/Austrian DPV-Wiss database**. Diabetes Care 33 (2010) 2010-2012.
12. Yu L, Liu Y, Miao D, Wenzlau J, Davidson H, Hutton J, Eisenbarth GS. **Triple chimeric islet autoantigen IA2-ZnT8WR to facilitate islet autoantibody determination**. J Immunol Methods 353 (2010) 20-23.





Schema di dispensazione per il test ELISA

Calibratori	Controlli	Campioni
-------------	-----------	----------

Calibratori 1 a 6	50 µl		
Controllo negativo		50 µl	
Controllo positivo		50 µl	
Campione di siero			50 µl
Tampone di dil. campione	25 µl		

Agitare per 5 sec a 500 rpm ed incubare per 16 - 20 ore
a temperatura tra +4°C e +8°C

lavare 3x

IA2 freddo	100 µl
------------	--------

Incubare per 1 ora a +4°C - +8°C

lavare 3x

Coniugato enzimatico	100 µl
----------------------	--------

Incubare per 20 minuti a temperatura ambiente
su di un agitatore a 500 rpm

lavare 3x

Substrato	100 µl
-----------	--------

Incubare per 20 minuti a temperatura ambiente al buio

Soluzione di arresto	100 µl
----------------------	--------

Agitare delicatamente e leggere l'assorbanza a 450 nm e poi a 405 nm

Anti-Trasportatore 8 dello zinco ELISA

Scheda tecnica




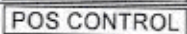

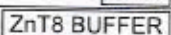
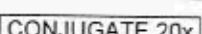








CODICE NO.	ANTICORPI ANTI	SUBSTRATO	FORMATO
EA 1027-9601	Trasportatore 8 dello zinco (ZnT8)	Pozzetti coattati con Ag	96 x 01 (96)

Indicazione: Il test immunoenzimatico ELISA è un saggio quantitativo in vitro per la determinazione nel siero o nel plasma degli anticorpi umani diretti contro il trasportatore 8 dello zinco (ZnT8) a supporto della diagnosi del diabete mellito di tipo 1 (diabete mellito insulino-dipendente, IDDM). Il prodotto è progettato per essere usato come IVD.

Applicazione: Gli autoanticorpi diretti contro il trasportatore 8 dello zinco sono riscontrabili nel 56% a 72% dei pazienti pediatrici nel momento in cui viene diagnosticato il diabete mellito di tipo I, e sono rilevabili già diversi anni prima della manifestazione clinica della malattia. Costituiscono inoltre un importante rilievo clinico negli adulti, poiché la presenza degli anticorpi anti ZnT8 può essere predittivo della trasformazione del diabete autoimmune latente negli adulti (LADA) in diabete insulino-dipendente. Gli ZnT8 si manifestano nel 26% dei pazienti affetti da diabete mellito di tipo I in cui non è stata rilevata la presenza di autoanticorpi anti GAD, IA2 o insulina.

Principio del test: Il kit contiene una micropiastra con strip dotate ciascuna di 8 pozzetti frazionabili coattati con gli antigeni anti-trasportatore 8 dello zinco. Nella prima reazione, i campioni vengono incubati nei pozzetti. Nel caso di campioni positivi, anticorpi specifici si legheranno agli antigeni. Gli anticorpi legati sono in grado di agire in modo bivalente, formando un ponte tra gli antigeni coattati nei pozzetti e gli ZnT8 marcati con biotina, che vengono aggiunti in un secondo passaggio. Per evidenziare la biotina legata, si esegue una terza incubazione utilizzando streptavidina coniugata con un enzima (coniugato enzimatico) che catalizza una reazione colorimetrica. L'intensità di colore è proporzionale alla concentrazione di anticorpi anti ZnT8.

Contenuto del kit:

Componente	Colore	Formato	Simbolo
1. Micropiastra con antigeni coattati nei pozzetti micropiastra con 12 strip, ciascuna di 8 pozzetti frazionabili; pronta per l'uso	---	12 x 8	
2. Calibratori da 1 a 5 10 / 20 / 75 / 500 / 2000 UR/ml (umano), pronti per l'uso	incolore	5 x 0,7 ml	
3. Controllo negativo , (umano), pronto per l'uso	incolore	1 x 0,7 ml	
4. Controllo positivo , (umano), pronto per l'uso	incolore	1 x 0,7 ml	
5. ZnT8 , ZnT8 marcato con biotina, liofilizzato	incolore	3 x 5,5 ml	
6. Tampone ZnT8 , pronto per l'uso	rosa	2 x 15 ml	
7. Coniugato enzimatico streptavidina marcata con perossidasi, concentrato 20x	incolore	1 x 0,7 ml	
8. Tampone per coniugato , pronto per l'uso	incolore	1 x 15 ml	
9. Tampone di lavaggio , concentrato 10x	incolore	1 x 125 ml	
10. Cromogeno/substrato TMB/H ₂ O ₂ , pronto per l'uso	incolore	1 x 15 ml	
11. Soluzione d'arresto acido solforico 0,25 M, pronta per l'uso	incolore	1 x 12 ml	
12. Foglio plastificato	---	3 pezzi	
13. Certificato del controllo di qualità	---	1 protocollo	
14. Scheda tecnica	---	1 libretto	
 Descrizione del lotto	  Temperatura di conservazione  Utilizzabile integro fino al		
 Dispositivo medico-diagnostico in vitro			

Gli aggiornamenti rispetto alla versione precedente sono contrassegnati in grigio.



Preparazione e stabilità dei reagenti

Nota: Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C) circa 30 minuti prima dell'uso. **Eccezione:** ZnT8 marcato con biotina e tampone ZnT8 (tra +2°C e +8°C).

Dopo il primo utilizzo, i reagenti si mantengono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati ad una temperatura tra +2°C e +8°C e protetti da contaminazioni, salvo indicazioni riportate di seguito.

- **Pozzetti coattati:** Aprire l'involucro protettivo richiudibile in corrispondenza degli incavi posizionati sopra la chiusura a pressione. Aprire l'involucro solo quando le strip hanno raggiunto la temperatura ambiente per evitare la formazione di condensa sulla superficie dei pozzetti. Riposizionare immediatamente i pozzetti non utilizzati nell'involucro protettivo e sigillarlo utilizzando la chiusura a pressione (non rimuovere il sacchetto deumidificatore).
Una volta aperto l'involucro, i pozzetti coattati con l'antigene possono essere conservati in un luogo asciutto ad una temperatura tra +2°C e +8°C per 1 mese.
- **Calibratori e controlli:** Pronti per l'uso. I reagenti devono essere miscelati con cura prima dell'utilizzo.
- **ZnT8 marcato con biotina:** Liofilizzato. Ricostituire il contenuto di un flacone con 5,5 ml di tampone ZnT8. Se si utilizza più di un flacone, una volta ricostituiti, unire i contenuti di ciascun flacone e miscelare delicatamente prima dell'uso. Evitare la formazione di bolle d'aria. Una volta ricostituito, lo ZnT8 marcato con biotina rimane stabile per al massimo 3 giorni se conservato ad una temperatura tra +2°C e +8°C.
- **Coniugato enzimatico:** Il coniugato enzimatico è concentrato 20x. La quantità richiesta deve essere prelevata dal flacone usando puntali puliti e deve essere diluita 1:20 nel tampone per coniugato (1 parte di reagente + 19 parti di tampone per coniugato). Miscelare accuratamente prima dell'uso. Il coniugato enzimatico correttamente diluito rimane stabile per 16 settimane se conservato ad una temperatura tra +2°C e +8°C.
- **Tampone di lavaggio:** Il tampone di lavaggio è concentrato 10x. Se nel tampone concentrato si dovessero formare dei cristalli, riscaldarlo a +37°C e miscelare con cura prima di eseguire le diluizioni. La quantità richiesta deve essere prelevata dall'apposito flacone usando puntali puliti, e diluita con acqua deionizzata o distillata (1 parte di reagente + 9 parti di acqua distillata).
Ad esempio: Per 1 strip, diluire 5 ml di tampone concentrato in 45 ml di acqua.
Il tampone di lavaggio correttamente diluito rimane stabile fino alla data di scadenza indicata per 4 settimane se correttamente utilizzato e conservato tra +2°C e +8°C.
- **Cromogeno/substrato:** Pronto per l'uso. Chiudere il flacone immediatamente dopo l'uso, poiché il contenuto è sensibile alla luce. La soluzione cromogeno/substrato deve essere incolore. Non utilizzare la soluzione se presenta una colorazione blu.
- **Soluzione d'arresto:** Pronta per l'uso.

Conservazione e stabilità: Il kit deve essere conservato a una temperatura compresa tra +2°C e +8°C. Non congelare. Se mantenuti integri, tutti i componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata.

Smaltimento dei residui: I campioni del paziente, i calibratori, i controlli e le strip incubate devono essere trattati come rifiuti con rischio infettivo. Tutti i reagenti devono essere smaltiti in base alla normativa locale vigente.

Avvertenza: I calibratori ed i controlli di origine umana sono risultati negativi per HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Nonostante ciò, i materiali devono essere gestiti come potenzialmente infettivi e maneggiati con cura. Alcuni reagenti contengono sodio azide in una concentrazione inferiore alla soglia dichiarabile. Evitare il contatto con la pelle.

Preparazione e stabilità dei campioni

Campioni: Siero umano, plasma eparinato o plasma citrato. Non utilizzare campioni fortemente emolitici o lipemici.

Stabilità: I campioni dei pazienti da testare possono essere conservati, in generale, ad una temperatura tra +2°C e +8°C per **14 giorni**. I campioni possono essere conservati ad una temperatura uguale o inferiore a -20°C. Ripetuti congelamenti e scongelamenti sono da evitare.



Esecuzione del test

Incubazione del campione: (1° passaggio)

Trasferire **25 µl** dei calibratori, dei controlli positivo e negativo e dei campioni nei singoli pozzetti seguendo il protocollo di lavoro. Lasciare un pozzetto vuoto per il bianco. Coprire il supporto e **agitare per 5 secondi su agitatore per micropiastra (500 rpm, agitatore rotante orizzontale con ampiezza di agitazione di circa 3 mm, ad es. agitatore per micropiastra TPM 4 Sarstedt o agitatore per micropiastra Compact Digital di Thermo Scientific)** e incubare per **16 a 20 ore** ad una temperatura **tra +2°C e +8°C**.

Lavaggio:

Manuale: Svuotare i pozzetti e successivamente lavare per 3 volte utilizzando per ciascun pozzetto 300 µl di tampone di lavaggio correttamente diluito.
Automatico: Rimuovere il foglio plastificato e lavare i pozzetti per 3 volte con 400 µl di tampone di lavaggio correttamente diluito (esempio di impostazione del programma: TECAN Columbus Washer "Overflow Mode").

Per ogni ciclo di lavaggio, lasciare il tampone di lavaggio per 30 a 60 secondi in ciascun pozzetto, quindi svuotare i pozzetti. Dopo il lavaggio (manuale e automatico), capovolgere la piastra e rimuovere tutto il tampone di lavaggio residuo battendo vigorosamente su della carta assorbente.
Le posizioni libere della strip devono essere riempite con pozzetti vuoti dello stesso formato di quelli utilizzati per il parametro da analizzare.

Incubazione di ZnT8: (2° passaggio)

Depositare **100 µl** di ZnT8 (ZnT8 marcato con biotina) refrigerata in ciascun pozzetto della micropiastra (eccetto il pozzetto vuoto). Coprire il supporto e incubare per **1 ora** ad una temperatura **tra +2°C e +8°C**.

Lavaggio:

Svuotare i pozzetti. Lavare come descritto sopra.

Incubazione del coniugato: (3° passaggio)

Depositare **100 µl** di coniugato enzimatico (avidina marcata con perossidasi) in ciascun pozzetto della micropiastra (eccetto il pozzetto vuoto). Coprire il supporto e incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C) su un **agitatore per micropiastre a 500 rpm**.

Lavaggio:

Svuotare i pozzetti. Lavare come descritto sopra.

Incubazione del substrato: (4° passaggio)

Depositare **100 µl** della soluzione cromogeno/substrato in ciascun pozzetto della micropiastra. Incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C; proteggere la piastra dalla luce diretta).

Arresto:

Depositare **100 µl** della soluzione di arresto in ciascun pozzetto della micropiastra (incluso il pozzetto vuoto) nello stesso ordine e alla stessa velocità con cui è stata aggiunta la soluzione cromogeno/substrato.

Misurazione:

La **misura fotometrica** dell'intensità del colore deve essere effettuata **ad una lunghezza d'onda di 450 nm e poi a 405 nm** e ad una lunghezza d'onda di riferimento tra 620 nm e 650 nm **entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione d'arresto**. Prima di effettuare la misurazione, agitare delicatamente la piastra per assicurare una distribuzione omogenea della soluzione.



Protocollo di lavoro

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BI	P 1	P 9	P 17								
B	C 1	P 2	P 10	P 18								
C	C 2	P 3	P 11	P 19								
D	C 3	P 4	P 12	P 20								
E	C 4	P 5	P 13	P 21								
F	C 5	P 6	P 14	P 22								
G	neg.	P 7	P 15	P 23								
H	pos.	P 8	P 16	P 24								

Il protocollo riportato sopra per micropiastre 1 a 4 è un esempio di **analisi quantitativa** di 24 campioni (da P 1 a P 24).

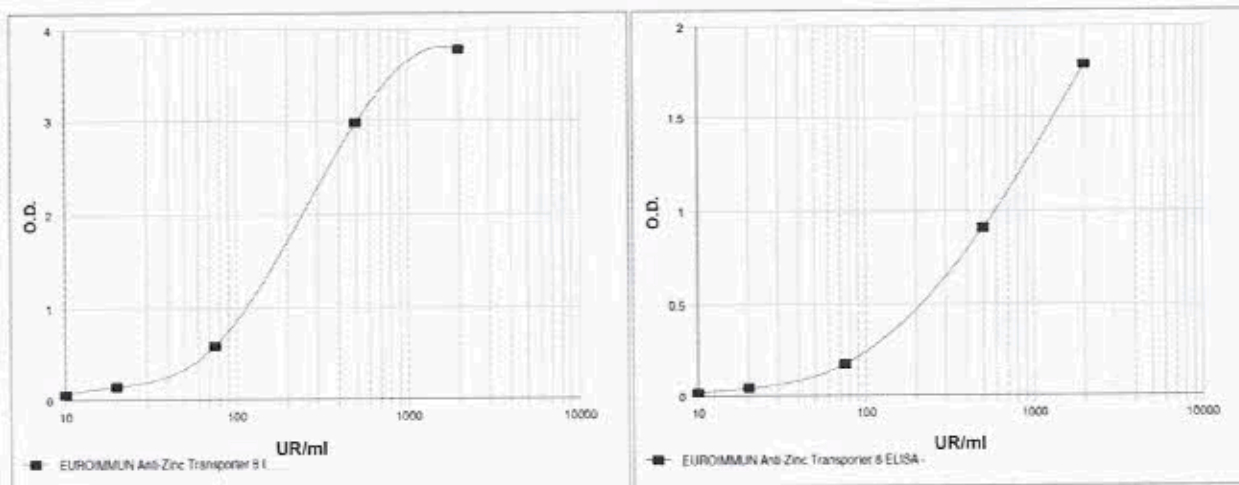
Il pozzetto vuoto (BI), i calibratori (da C 1 a C 5), i controlli negativo (neg.) e positivo (pos.) e i campioni sono stati incubati in singolo. L'affidabilità del test ELISA può essere migliorata duplicando le determinazioni per ciascun campione.

Sia il controllo positivo che quello negativo servono da controlli interni per valutare l'affidabilità del test. Il loro valore deve essere analizzato ad ogni esecuzione del test.

Calcolo dei risultati

Quantitativo: La curva di calibrazione, da cui può essere letta la concentrazione di anticorpi specifici nei campioni, si ottiene tracciando i valori di assorbanza misurati per i **calibratori da 1 a 5 (450 nm)** o per i **calibratori da 1 a 5 (405 nm)** rispetto alla concentrazione corrispondente. **Utilizzare la logistica a 4 parametri per il calcolo della curva standard al computer.** Se il fotometro non prevede un adeguamento automatico per il bianco, allora il valore del bianco dev'essere prima sottratto da tutti gli altri valori misurati. **Le concentrazioni più basse (<75 UR/ml, calibratore 3)** verranno lette utilizzando la curva di calibrazione da 450 nm (calibrazione da 1 a 4). **Le concentrazioni più alte (>75 UR/ml)** saranno lette dalla **curva di calibrazione da 405 nm** (calibratori da 1 a 5). I grafici riportati sono esempi di una tipica curva di calibrazione. Non usare questo grafico per la determinazione della concentrazione degli anticorpi nei campioni dei pazienti.

Calibratore/Controllo	Assorbanza a 450 nm	Assorbanza a 405 nm
Bianco	<0,001	<0,001
Calibratore 1	0,057	0,017
Calibratore 2	0,143	0,042
Calibratore 3	0,583	0,174
Calibratore 4	2,974	0,908
Calibratore 5	---	1,789
Controllo negativo	0,003	0,001
Controllo positivo	1,042	0,315



Se l'assorbanza di un campione si trova al di sotto del valore del calibratore 1 (10 UR/ml), il risultato deve essere indicato come "<10 (UR/ml)". Se l'assorbanza di un campione si trova al di sopra del valore del calibratore 5 (2000 UR/ml), il risultato deve essere indicato come ">2000 UR/ml". Si consiglia di testare il campione di nuovo in una nuova seduta di analisi con una diluizione, ad esempio, di 1:10 nel controllo negativo anti-ZnT8. Il risultato espresso in UR/ml, ottenuto dalla curva di calibrazione per questo campione, deve essere moltiplicato per un fattore di 10.

Il limite superiore dei valori normali (**valore di cut-off**) raccomandato da EUROIMMUN è di **15 unità relative (UR)/ml**. EUROIMMUN raccomanda di interpretare i risultati come riportato qui di seguito:

<15 UR/ml:	negativo
≥15 UR/ml:	positivo

Per le determinazioni in doppio, si dovrebbe prendere la media dei due valori. Se i due valori si discostano sostanzialmente l'uno dall'altro, EUROIMMUN consiglia di ripetere il test dei campioni.

Per effettuare una diagnosi, è importante considerare, oltre ai risultati sierologici, anche il quadro clinico del paziente e i suoi sintomi. Un risultato sierologico negativo non esclude la presenza di una malattia.

Caratteristiche del test

Calibrazione: Poiché non esiste alcun siero di riferimento internazionale per la determinazione degli anticorpi diretti contro il trasportatore 8 dello zinco, la calibrazione è stata eseguita in Unità Relative (UR/ml).

Per ciascun gruppo di test eseguito, le unità relative determinate per i controlli positivi e negativi devono rientrare all'interno dei limiti indicati per lo specifico lotto. Nel kit è contenuto un certificato del controllo di qualità dove sono riportati questi valori di riferimento. Se i valori specificati per i controlli non vengono raggiunti, i risultati del test possono essere inesatti e il test deve essere ripetuto.

Antigene: I singoli pozzetti della micropiastra sono stati coattati con la proteina del trasportatore 8 dello zinco.

Limite di rilevazione: Il limite inferiore di rilevazione è definito come il valore medio ottenuto dalla somma di un campione senza analita e di un valore pari a tre volte la deviazione standard e rappresenta il più piccolo titolo anticorpale determinabile. Il limite di rilevazione inferiore del test Anti-Trasportatore 8 dello zinco ELISA è 1,2 UR/ml.



Specificità analitica: Il test ELISA determina in modo specifico gli autoanticorpi umani anti-Trasportatore 8 dello zinco.

	n	Positivo per Anti-Trasportatore 8 dello zinco ELISA
Sieri caratterizzati sierologicamente		
Fattori reumatoidi	26	0%
Anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina	9	0%
Sieri caratterizzati clinicamente		
Malattia di Addison (anticorpi anti 21-OH)	23	9%
Neuromielite ottica (anticorpi anti-AQP-4)	3	0%
Tiroidite di Hashimoto (anticorpi anti-TPO, TG)	24	0%
Malattia di Graves (TRAb)	24	4%

Interferenza: I sieri itterici con una concentrazione fino a 20 mg/dl di bilirubina non hanno mostrato alcun effetto sui risultati analitici di questo test.

Riproducibilità: La riproducibilità del test è stata analizzata determinando il coefficiente di variazione intra- ed inter-saggio (CV) utilizzando 5 campioni di cui 4 con valori su punti diversi della curva di calibrazione. I CV intra-saggio sono stati calcolati sulla base di 25 determinazioni ed i CV inter-saggio sono stati calcolati su 20 determinazioni.

Variazione intra-saggio, n = 25		
Campione	Media (UR/ml)	CV (%)
1	15,9	3,1
2	24,5	3,5
3	62,7	6,2
4	159,5	6,2
5	283,3	8,5

Variazione inter-saggio, n = 20		
Campione	Media (UR/ml)	CV (%)
1	26,6	8,7
2	63,6	7,5
3	101,9	9,3
4	373,9	8,7

Sensibilità e specificità clinica: Sono stati studiati 50 campioni di pazienti recentemente diagnosticati con il diabete mellito di tipo I mediante il test Anti-Trasportatore 8 dello zinco ELISA nell'ambito del Islet Autoantibody Standardisation Program (IASP). Il 72% dei campioni è risultato positivo. Inoltre, sono stati studiati 90 sieri di controllo mediante Anti-Trasportatore 8 dello zinco ELISA nell'ambito di IASP. Il 99% dei campioni è risultato negativo.

Range di riferimento: In uno studio condotto su 297 sieri di donatori di sangue sani, il 99% dei campioni ha restituito una concentrazione anticorpale inferiore al valore di cut-off di 15 UR/ml.

Significato clinico

Il diabete mellito di tipo I è una malattia autoimmune che porta alla distruzione delle cellule produttrici di insulina, le cellule beta delle cellule delle isole di Langerhans nel pancreas. La malattia deriva da una predisposizione genetica così come da fattori esogeni, tra cui infezioni virali, il tipo di dieta e il peso eccessivo. Nel diabete mellito di tipo I, gli autoanticorpi si dirigono contro gli antigeni citoplasmatici delle cellule insulari: l'isoforma 65 kDa dell'enzima acido glutammico decarbossilasi (GAD65), le proteine omologhe alla tirosina fosfatasi IA2 (IA2α e IA2β), il trasportatore 8 dello zinco e l'insulina [1].

Il trasportatore 8 dello zinco (ZnT8) è una proteina transmembrana delle cellule insulari del pancreas che trasporta gli ioni di zinco dal citoplasma ai granuli di secrezione delle cellule beta, dove vengono legati dall'insulina. Gli ioni di zinco sono secreti con l'insulina. ZnT8 è stato identificato come auto-antigene importante per il diabete di tipo 1 nel 2007. Gli anticorpi anti-ZnT8 sono determinabili nel siero di molti bambini a cui è stato diagnosticato il prediabete. Questi anticorpi permangono fino al manifestarsi del diabete di tipo 1. Nei primi anni dall'insorgenza della malattia, i livelli di anti-ZnT8 si riducono rapidamente [2, 3, 4].



La prevalenza di anti-ZnT8 all'insorgenza della malattia è stata determinata in diversi studi: 56% in Italia [5], 61% in Francia [2], 72% nella Repubblica Ceca [6] e 70% in Giappone [7]. Negli Stati Uniti, la maggior parte dei pazienti positivi per gli anti-ZnT8 sono stati individuati in un'età compresa tra gli 8 e i 16 anni, in Cina tra i 10 e i 19 anni [2], in Italia tra gli 0 e i 6 anni [5] nella Repubblica Ceca tra gli 0 e i 5 anni [6] e in Giappone al di sotto dei 10 anni [7]. Dopo i 20 anni, la frequenza degli anti-ZnT8 si riduce [2, 6].

Il gene di ZnT8 presenta un polimorfismo alla posizione 325, che rappresenta tre isoforme proteiche: arginina (R)325, triptofano (W)325 e glutammina (Q)325. Gli autoanticorpi anti ZnT8 possono essere diretti contro tutte e tre le isoforme [2, 7].

Gli anti-ZnT8 si riscontrano anche in quasi il 25% dei pazienti affetti da diabete autoimmune latente negli adulti (LADA). Questo dato è importante nella valutazione clinica, poiché la presenza degli anti-ZnT8, in associazione ad altri autoanticorpi, è predittivo della transizione dei pazienti LADA in pazienti insulino-dipendenti [2, 8].

La rilevazione congiunta degli anti-ZnT8, -GAD65, -IA2 e -insulina porta il tasso di rilevazione del diabete mellito di tipo I al 98% all'insorgenza della malattia [3].

Informazioni relative al brevetto

Sono applicabili i seguenti brevetti:

Brevetti RSR: brevetto europeo EP1563071 (B1) ed EP2118309 (B2), brevetto cinese CN1738900 (B), brevetto giapponese 4498144 e 5694668 e brevetto USA 7,851,164 (B2) e 9,023,984 (B2).

Bibliografia

1. Canivell S, Gomis R. **Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus.** Autoimmun Rev. 2014 Apr-May;13(4-5):403-7.
2. Garnier L, Marchand L, Benoit M, Nicolino M, Bendelac N, Wright C, Moulin P, Lombard C, Thivolet C, Fabien N. **Screening of ZnT8 autoantibodies in the diagnosis of autoimmune diabetes in a large French cohort.** Clin Chim Acta. 2018 Mar;478:162-5.
3. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC. **The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Oct 23; 104(43):17040-5.
4. Wenzlau JM, Walter M, Gardner TJ, Frisch LM, Yu L, Eisenbarth GS, Ziegler AG, Davidson HW, Hutton JC. **Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects.** J Clin Endocrinol Metab. 2010 Oct;95(10): 4712-9.
5. Fabris M, Zago S, Liguori M, Trevisan MT, Zanatta M, Comici A, Zanette G, Carlin E, Curcio F, Tonutti E. **Anti-zinc transporter protein 8 autoantibodies significantly improve the diagnostic approach to type 1 diabetes: an Italian multicentre study on paediatric patients.** Auto Immun Highlights. 2015 Aug;6(1-2):17-22.
6. Petruzelkova L, Ananieva-Jordanova R, Vcelakova J, Vesely Z, Stechova K, Lebl J, Dusatkova P, Sumnik Z, Coles R, Powell M, Furmaniak J, Rees Smith B, Kolouskova S. **The dynamic changes of zinc transporter 8 autoantibodies in Czech children from the onset of Type 1 diabetes mellitus.** Diabet Med. 2014 Feb;31(2):165-71.
7. Kawasaki E. **ZnT8 and type 1 diabetes.** Endocr J. 2012;59(7):531-7.
8. Lampasona V, Petrone A, Tiberti C, Capizzi M, Spoletini M, di Pietro S, Songini M, Bonicchio S, Giorgino F, Bonifacio E, Bosi E, Buzzetti R; Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study Group. **Zinc transporter 8 antibodies complement GAD and IA-2 antibodies in the identification and characterization of adult-onset autoimmune diabetes: Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) 4.** Diabetes Care. 2010 Jan;33(1):104-8.

Protocollo di lavoro per ELISA

	Calibratori	Controlli	Campioni
Vuoto			
Calibratori da 1 a 5	25 µl		
Controllo negativo		25 µl	
Controllo positivo		25 µl	
Campione del paziente			25 µl

Agitare per 5 sec a 500 rpm e incubare per 16 e 20 ore tra +2°C e +8°C.

lavaggio 3x

ZnT8 refrigerato (eccetto il pozzetto vuoto)	100 µl
--	--------

Incubare per 1 ora tra +2°C e +8°C

lavaggio 3x

Coniugato enzimatico (eccetto il pozzetto vuoto)	100 µl
--	--------

Incubare per 20 minuti a temperatura ambiente su un agitatore impostato a 500 rpm

lavaggio 3x

Substrato (compreso il pozzetto vuoto)	100 µl
--	--------

Incubare per 20 minuti a temperatura ambiente al buio

Soluzione d'arresto (compreso il pozzetto vuoto)	100 µl
--	--------

Agitare brevemente e leggere l'assorbanza a 450 nm e poi a 405 nm.

Se il fotometro non prevede un adeguamento automatico per il bianco, allora il valore del bianco dev'essere prima sottratto da tutti gli altri valori misurati.

Anti-PLA2R ELISA (IgG)

Scheda tecnica







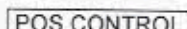

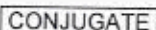
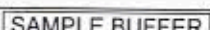
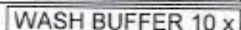
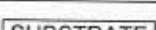

CODICE NO.	ANTICORPI ANTI	CLASSE IG	SUBSTRATO	FORMATO
EA 1254-9601 G	PLA2R	IgG	Ag coattati nei pozzetti della micropiastra	96 x 01 (96)



Indicazioni: glomerulonefrite membranosa (MGN).

Applicazione: Gli autoanticorpi di classe IgG diretti contro i recettori della fosfolipasi A2 sono altamente specifici per la diagnosi della glomerulonefrite membranosa, e sono rilevabili nel 70%-75% dei sieri dei pazienti affetti da questa malattia. Il test ELISA consente la determinazione qualitativa e quantitativa degli autoanticorpi umani di classe IgG diretti contro i recettori PLA2. Il successo terapeutico può essere monitorato misurando il titolo degli anticorpi anti-PLA2R. Un aumento, decremento o l'assenza del titolo anticorpale sono generalmente indice di un cambiamento del quadro clinico. La determinazione del titolo anticorpale ha un alto valore predittivo rispetto ad un'eventuale remissione clinica, ricaduta o per la valutazione del rischio in seguito ad un trapianto del rene.



Principio del test: Il kit ELISA permette una determinazione semiquantitativa o quantitativa in vitro per la determinazione di anticorpi umani di classe IgG diretti contro PLA2R nel siero o nel plasma. Il kit contiene una micropiastra con strip dotate ciascuna di 8 pozzetti frazionabili coattati con PLA2R. Nella prima reazione, i campioni vengono incubati nei pozzetti. Nel caso di campioni positivi, gli anticorpi specifici di classe IgG (ma anche IgA e IgM) si legano agli antigeni. Per evidenziare gli anticorpi legati, si esegue una seconda incubazione utilizzando anticorpi di classe IgG coniugati con un enzima (coniugato enzimatico) che catalizzano una reazione colorimetrica.

Contenuto del test kit:

Componente	Colore	Formato	Simbolo
1. Micropiastra con antigeni coattati nei pozzetti: 12 strip ciascuna con 8 pozzetti frazionabili, pronta per l'uso	---	12 x 8	 STRIPS
2. Calibratore 1 2 RU/ml (IgG, umane), pronto per l'uso	rosso	1 x 1,0 ml	 CAL 1
3. Calibratore 2 20 RU/ml (IgG, umane), pronto per l'uso	rosso	1 x 2,0 ml	 CAL 2
4. Calibratore 3 100 RU/ml (IgG, umane), pronto per l'uso	rosso	1 x 1,0 ml	 CAL 3
5. Calibratore 4 500 RU/ml (IgG, umane), pronto per l'uso	rosso	1 x 1,0 ml	 CAL 4
6. Calibratore 5 1500 RU/ml (IgG, umane), pronto a per l'uso	rosso	1 x 1,0 ml	 CAL 5
7. Controllo positivo (IgG, umane), pronto per l'uso	blu	1 x 2,0 ml	 POS CONTROL
8. Controllo negativo , (IgG, umane), pronto per l'uso	verde	1 x 2,0 ml	 NEG CONTROL
9. Coniugato enzimatico anticorpi anti IgG umane (coniglio) coniugati con perossidasi, pronto a per l'uso	verde	1 x 12 ml	 CONJUGATE
10. Tampone di diluizione , pronto per l'uso	azzurro	1 x 100 ml	 SAMPLE BUFFER
11. Tampone di lavaggio , concentrato 10x	incolore	1 x 100 ml	 WASH BUFFER 10 x
12. Cromogeno/substrato TMB/H ₂ O ₂ , pronto per l'uso	incolore	1 x 12 ml	 SUBSTRATE
13. Soluzione di arresto acido solforico 0,5 M, pronta per l'uso	incolore	1 x 12 ml	 STOP SOLUTION
14. Scheda tecnica	---	1 libretto	
15. Certificato del controllo di qualità	---	1 protocollo	

 Descrizione del lotto
 Diagnostica in vitro



 Temperatura di conservazione
 Utilizzabile integro fino al



Preparazione e stabilità dei reagenti

Nota: Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C) circa 30 minuti prima dell'uso. Dopo il primo utilizzo, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati ad una temperatura tra +2°C e +8°C e protetti da contaminazioni, salvo diverse indicazioni riportate di seguito.

- **Pozzetti coattati:** Aprire l'involucro protettivo richiudibile in corrispondenza degli incavi posizionati sopra la chiusura a pressione. Aprire l'involucro solo quando le strip hanno raggiunto la temperatura ambiente per evitare la formazione di condensa sulla superficie dei pozzetti. Riposizionare immediatamente i pozzetti non utilizzati nell'involucro protettivo e sigillarlo utilizzando la chiusura a pressione (non rimuovere il sacchetto deumidificatore). Una volta aperto l'involucro, i pozzetti coattati con l'antigene possono essere conservati in un luogo asciutto ad una temperatura tra +2°C e +8°C per 4 mesi.
- **Calibratori e controlli:** Pronti per l'uso. I reagenti devono essere miscelati con cura prima dell'utilizzo.
- **Coniugato enzimatico:** Pronto per l'uso. Il coniugato enzimatico deve essere miscelato con cura prima dell'utilizzo.
- **Tampone di diluizione:** Pronto per l'uso.
- **Tampone di lavaggio:** Il tampone di lavaggio viene fornito concentrato 10x. Se nel tampone concentrato si dovessero formare dei cristalli, riscaldarlo a +37°C e miscelare con cura prima di diluirlo. La quantità richiesta deve essere prelevata dal flacone, usando puntali puliti, e diluita con acqua deionizzata o distillata (1 parte di reagente + 9 parti di acqua distillata).
Ad esempio, per 1 strip: diluire 5 ml di tampone concentrato in 45 ml di acqua distillata.
Il tampone di lavaggio diluito pronto per l'uso rimane stabile per 4 settimane se conservato tra +2°C e +8°C e correttamente utilizzato.
- **Soluzione cromogeno/substrato:** Pronta per l'uso. Chiudere il flacone immediatamente dopo l'uso, poiché il contenuto è sensibile alla luce ☼. La soluzione cromogeno/substrato deve essere incolore. Non utilizzare la soluzione se presenta una colorazione blu.
- **Soluzione d'arresto:** Pronta per l'uso.

Conservazione e stabilità: Il kit deve essere conservato a temperatura tra +2°C e +8°C. Non congelare. Se mantenuti integri, tutti i componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata.

Smaltimento dei residui: I campioni di siero o plasma, i controlli e le strip incubate devono essere trattati come residui con rischio infettivo. Tutti i reagenti devono essere smaltiti in base alla normativa locale vigente.

Avvertenza: I calibratori e i controlli di origine umana sono risultati negativi per HBsAg, e per gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Nonostante ciò, i materiali devono essere gestiti come potenzialmente infettivi e maneggiati con cura. Alcuni reagenti contengono sodio azide in una concentrazione inferiore alla soglia dichiarabile. Evitare il contatto con la pelle.

Preparazione e stabilità dei campioni

Campioni: Siero umano, plasma EDTA, plasma eparinato o plasma citrato.

Stabilità: I campioni da testare possono essere conservati tra +2°C e +8°C fino a 14 giorni. I campioni diluiti devono essere incubati entro la giornata.

Diluizione campione: I campioni devono essere diluiti 1:101 con il tampone di diluizione. Ad esempio: diluire 10 µl di siero in 1,0 ml di tampone e miscelare bene mediante vortex (la pipetta usata per prelevare il campione non deve essere utilizzata per miscelare).

NOTA: I calibratori ed i controlli sono prediluiti e pronti all'uso; non diluirli.



Esecuzione del test

Per le **analisi semiquantitative** incubare il **calibratore 2** assieme ai controlli positivo e negativo e ai campioni di siero. Per le **analisi quantitative** incubare i **calibratori da 1 a 5** assieme ai controlli positivo e negativo e ai campioni di siero.

Esecuzione del test manuale (parzialmente)

Incubazione del campione:
(1° passaggio)

Trasferire 100 µl dei calibratori, dei controlli positivo, del controllo negativo o dei campioni diluiti nei singoli pozzetti seguendo il protocollo di lavoro. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C).

Lavaggio:

Manuale: Svuotare i pozzetti e successivamente lavare per 3 volte, utilizzando per ciascun pozzetto 300 µl di tampone di lavaggio correttamente diluito.

Automatico: Lavare i pozzetti per 3 volte con 450 µl di tampone di lavaggio correttamente diluito (es. di impostazione del programma: TECAN Columbus Washer "Overflow Mode").

Per ogni ciclo di lavaggio, lasciare il tampone di lavaggio per 30 a 60 secondi in ciascun pozzetto, quindi svuotare i pozzetti. Dopo il lavaggio (manuale e automatico), capovolgere la piastra e rimuovere tutto il tampone di lavaggio residuo battendo vigorosamente su della carta assorbente.

Nota: I residui di liquido (>10 µl) che rimangono all'interno di ogni pozzetto, dopo il lavaggio, possono interferire con il substrato e abbassare i valori di assorbanza registrati dallo spettrofotometro. Lavaggi insufficienti (es. meno di 3 cicli di lavaggio, volumi troppo piccoli di tampone di lavaggio o tempi di lavaggio troppo brevi) possono alzare i valori di assorbanza. Le posizioni libere della strip devono essere riempite con pozzetti vuoti dello stesso formato di quelli utilizzati per il parametro da analizzare.

Incubazione del coniugato:
(2° passaggio)

Depositare 100 µl di coniugato enzimatico (anticorpi anti-IgG umane coniugati con perossidasi) in ciascun pozzetto della micropiastra. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente (da +18°C a +25°C).

Lavaggio:

Svuotare i pozzetti. Lavare come descritto sopra.

Incubazione del substrato:
(3° passaggio)

Depositare 100 µl di soluzione cromogeno/substrato in ciascun pozzetto della micropiastra. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C). Proteggere la piastra dalla luce diretta.

Arresto della reazione:

Depositare 100 µl della soluzione di arresto in ciascun pozzetto della micropiastra nello stesso ordine e alla stessa velocità con cui è stata aggiunta la soluzione cromogeno/substrato.

Misurazione:

La **misura fotometrica** dell'intensità del colore deve essere effettuata ad una lunghezza d'onda di 450 nm e ad una lunghezza d'onda di riferimento tra 620 nm e 650 nm **entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione d'arresto**. Prima di effettuare la misurazione, agitare delicatamente la piastra per assicurare una distribuzione omogenea della soluzione.



Esecuzione del test usando una strumentazione completamente automatizzata

La diluizione dei sieri e l'esecuzione del test sono state effettuate utilizzando uno strumento completamente automatizzato. Le condizioni di incubazione programmate nel software autorizzato da EUROIMMUN possono leggermente discostarsi dalle specifiche riportate nella scheda tecnica ELISA. Tuttavia, queste condizioni sono state validate nel rispetto della combinazione degli strumenti Analyzer I, Analyzer I-2P e questo test ELISA EUROIMMUN. I documenti relativi alla validazione possono essere richiesti.

E' possibile eseguire il test anche su altri strumenti completamente automatizzati o su altri sistemi aperti, comunque la combinazione strumento-test dovrebbe essere validata dall'operatore.

Protocollo di lavoro

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C 2	P 6	P 14	P 22			C 1	P 2	P 10	P 18		
B	pos.	P 7	P 15	P 23			C 2	P 3	P 11	P 19		
C	neg.	P 8	P 16	P 24			C 3	P 4	P 12	P 20		
D	P 1	P 9	P 17	P 25			C 4	P 5	P 13	P 21		
E	P 2	P 10	P 18				C 5	P 6	P 14	P 22		
F	P 3	P 11	P 19				pos.	P 7	P 15	P 23		
G	P 4	P 12	P 20				neg.	P 8	P 16	P 24		
H	P 5	P 13	P 21				P 1	P 9	P 17	P 25		

Il protocollo riportato sopra per le strip da 1 a 4 è un esempio di analisi qualitativa/semiquantitativa di 25 campioni di siero (da P 1 a P 25).

Il protocollo riportato sopra per le strip da 7 a 10 è un esempio di analisi quantitativa di 25 campioni di siero (da P 1 a P 25).

I calibratori (da C 1 a C 5), il controllo positivo (pos.) e negativo (neg.) e i campioni di siero (P) sono stati incubati in singolo. L'affidabilità del test ELISA può essere migliorata duplicando le determinazioni per ciascun campione. Sia il controllo positivo che quello negativo servono da controlli interni per valutare l'affidabilità del test. Il loro valore deve essere analizzato ad ogni esecuzione del test.

Calcolo dei risultati

Qualitativo/semiquantitativo: I risultati possono essere valutati semiquantitativamente calcolando il rapporto del valore di assorbanza del controllo o del campione di siero diviso il valore di assorbanza del calibratore 2. Calcolare il rapporto mediante la seguente formula:

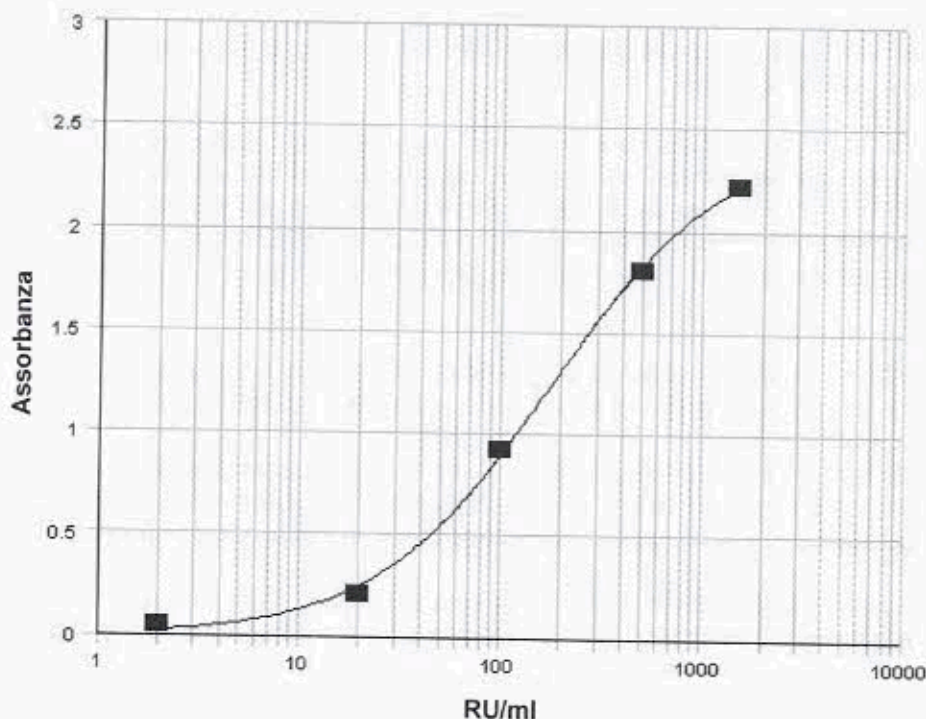
$$\frac{\text{Assorbanza del controllo o del campione}}{\text{Assorbanza del calibratore 2}} = \text{Ratio}$$

EUROIMMUN raccomanda di interpretare i risultati come riportato qui di seguito:

Ratio <0,7:	negativo
Ratio ≥da 0,7 a <1,0:	borderline
Ratio ≥1,0:	positivo



Quantitativo: La curva standard, da cui può essere letta la concentrazione degli anticorpi nei sieri campione, si ottiene da un tracciato point-to-point dei valori di assorbanza dei 5 sieri di calibrazione (lineare, asse y) contro le corrispondenti unità (logaritmico, asse x). La curva standard può essere calcolata con il computer mediante una delle seguenti tecniche di adattamento (curve fitting): logistica a 4 parametri, logistica a 5 parametri, spline fit, curva log/logit e curva lim/limit. Il grafico riportato sotto è un esempio di una tipica curva di calibrazione. Non usare questo grafico per la determinazione della concentrazione degli anticorpi nei campioni dei pazienti.



Se l'assorbanza di un campione di siero si trova al di sopra del valore del calibratore 5 (1500 (RU/ml), il risultato deve essere indicato come ">1500 (RU/ml)". È raccomandabile ritestare il campione in un nuovo ciclo di analisi con una diluizione, ad esempio, di 1:400. Il risultato espresso in RU/ml, ottenuto dalla curva di calibrazione per questo siero, deve essere moltiplicato per un fattore 4. Il limite superiore dei valori normali (valore di cut-off) raccomandato da EUROIMMUN è di 20 unità relative (RU)/ml. EUROIMMUN raccomanda di interpretare i risultati come riportato qui di seguito:

<14 RU/ml:	negativo
≥da 14 a <20 RU/ml:	borderline
≥20 RU/ml:	positivo

Per determinazioni eseguite in doppio, è necessario calcolare la media dei due valori. Se i due valori sono sostanzialmente diversi l'uno dall'altro, EUROIMMUN consiglia di ritestare i campioni.

Per effettuare una diagnosi, è importante considerare, oltre ai risultati sierologici, anche il quadro clinico del paziente.



Caratteristiche del test

Calibrazione: Non esiste alcun siero di riferimento internazionale per la determinazione degli anticorpi diretti contro l'antigene PLA2R; la calibrazione è stata, quindi, eseguita in Unità Relative (RU).

Per ciascun gruppo di test eseguito, i valori di assorbanza dei calibratori e le unità relative e/o i rapporti determinati per i controlli positivi e negativi devono trovarsi all'interno dei limiti indicati per lo specifico lotto. Nel kit è contenuto un certificato del controllo di qualità dove sono riportati questi valori di riferimento. Se i valori specificati per i controlli non vengono raggiunti, i risultati del test possono essere inesatti e il test deve essere ripetuto.

L'attività enzimatica così come l'attività di legame degli anticorpi sono temperatura dipendenti. Si consiglia quindi di utilizzare un termostato in tutti e tre i cicli di incubazione. Maggiore è la temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C) durante le fasi di incubazione, più alti saranno i valori di assorbanza. Variazioni corrispondenti verranno applicate anche ai tempi di incubazione. Tuttavia, i calibratori sono soggetti alle stesse influenze, con il risultato che tali variazioni saranno largamente compensate nel calcolo dei risultati.

Antigene: I pozzetti sono stati coattati con i recettori ricombinanti della fosfolipasi A2. La proteina ricombinante basata su cDNA umano è stato prodotto in una linea cellulare umana.

Linearità: La linearità di Anti-PLA2R ELISA (IgG) è stata studiata utilizzando almeno quattro diluizioni seriali di sieri di pazienti diversi. Per tutti, il coefficiente di determinazione R^2 è $> 0,95$. Il test Anti-PLA2R ELISA (IgG) è lineare almeno nel range di misurazione (da 6 RU/ml a 1500 RU/ml).

Limite di rilevazione: Il limite inferiore di rilevazione è definito come il valore medio ottenuto dalla somma di un campione senza analita e di un valore pari a tre volte la deviazione standard e rappresenta il più piccolo titolo anticorpale determinabile. Il limite di rilevazione inferiore del test Anti-PLA2R ELISA (IgG) è 0,6 RU/ml.

Cross-reattività: Questo ELISA è stato progettato per la determinazione esclusiva degli anticorpi di classe IgG diretti contro PLA2R. Questo test ELISA non ha dimostrato alcuna cross-reattività con sieri positivi per autoanticorpi specifici per la tiroidite ($n = 5$), Sindrome di Sjögren ($n = 5$), SSc ($n = 5$) ed RA ($n = 5$).

Interferenza: Sieri emolitici, lipemici ed itterici con una concentrazione superiore a, rispettivamente 10 mg/ml di emoglobina, 20 mg/ml di trigliceridi ed a 0,4 mg/ml di bilirubina non hanno mostrato alcun effetto sui risultati analitici di questo test.

Riproducibilità: La riproducibilità del test è stata analizzata determinando il coefficiente di variazione intra- e inter-saggio (CV) utilizzando tre sieri. I CV intra-saggio sono stati calcolati sulla base di 20 determinazioni e i CV inter-saggio sono stati calcolati sulla base di tre determinazioni in 10 diversi cicli di analisi.

Variazione intra-saggio, $n = 20$		
Siero	Media (RU/ml)	CV (%)
1	26	3,4
2	97	1,7
3	861	5,7

Variazione inter-saggio, $n = 3 \times 10$		
Siero	Media (RU/ml)	CV (%)
1	28	4,2
2	99	6,4
3	878	10,3



Sensibilità e specificità clinica: I sieri di 122 pazienti affetti da glomerulonefrite membranosa primaria (pMGN), un pannello di controllo di 342 pazienti affetti da altre patologie e 191 donatori sani sono stati studiati mediante EUROIMMUN Anti-PLA2R ELISA. La sensibilità del test ELISA per la pMGN è di 97,5%, con una specificità del 100%, compresi i risultati borderline.

n = 122		IIFT	
		positivo	negativo
ELISA	positivo	118	0
	borderline	1	0
	negativo	3	0

Pannello	Anti-PLA2R ELISA	
	n	(specificità) borderline / positivo
Altre glomerulonefriti	181	0 (100%)
Altre malattie autoimmuni	161	0 (100%)
Donatori di sangue	191	0 (100%)
Totale	533	0 (100%)

Range di riferimento: Sono stati analizzati i livelli anticorpali degli anticorpi anti-PLA2R di 191 sieri di donatori sani mediante il test EUROIMMUN ELISA. Le concentrazioni medie di anticorpi anti-PLA2R sono risultate pari a 0,4 RU/ml e l'intervallo dei valori si è attestato tra gli 0,0 e i 5,0 RU/ml. In presenza di un valore di interruzione di 20 RU/ml, lo 0% dei donatori di sangue risultavano essere positivi all'anti-PLA2R.

Valore di interruzione (cut-off)	Percentile
3,8 RU/ml	99.
5,0 RU/ml	100.

Significato clinico

La rilevazione degli autoanticorpi anti-recettori della fosfolipasi A2(PLA2R) risulta utile nella diagnosi della glomerulonefrite membranosa primaria (MGN, pMGN), conosciuta in precedenza sotto il nome di nefropatia membranosa idiopatica (IMN). La glomerulonefrite membranosa (MGN) è una malattia infiammatoria cronica dei glomeruli che è accompagnata dalla graduale riduzione della funzionalità renale.

Il meccanismo autoimmune della MGN, scoperto e descritto per la prima volta nel 2009, è il risultato di una reazione tra gli autoanticorpi e PLA2R (glicoproteine transmembrana), che sono espresse nei glomeruli umani sulla superficie dei podociti. Queste sono coinvolte nei processi regolatori nella cellula che seguono il legame della fosfolipasi. Fino ad ora sono stati descritti due gruppi principali di PLA2R (tipi M ed N): il tipo M del recettore della PLA2 è stato identificato come il principale antigene bersaglio degli autoanticorpi. Gli autoanticorpi diretti contro PLA2R sono considerati patogenicamente rilevanti, anche se l'esatta patogenesi è ancora sconosciuta. Gli autoanticorpi circolanti espressi dai pazienti affetti da MGN si lega a PLA2R sui podociti. Gli immunocomplessi vengono prodotti in situ, nell'area della membrana basale glomerulare. Qui innescano l'attivazione del complemento con conseguente danno ai podociti e alla barriera sangue-urina. Le proteine riescono ad entrare nell'urina primaria, con conseguente proteinuria. In alternativa, gli autoanticorpi agiscono da agonisti o antagonisti del recettore, provocando un danno alla struttura del podocita e quindi alla funzione di barriera.



MGN è la malattia renale più frequente con sindrome nefrotica. Con l'innalzarsi della proteinuria, aumenta il rischio a lungo termine di insufficienza renale con alta morbilità e mortalità, in particolare in associazione a complicanze tromboemboliche e cardiovascolari.

MGN è prevalente in tutti i gruppi etnici e generi, anche se risultano particolarmente colpiti gli uomini caucasici sopra i 40 anni. Nelle donne giovani con MGN sospetta, è necessario valutare un'eventuale nefrite da lupus. L'MGN è rara nei bambini (solamente il 2-3% dei problemi renali nei bambini).

I sintomi della MGN:

- Circa l'80% dei pazienti con MGN soffrono di sindrome nefrotica, associata in alcuni casi con edema severo agli arti inferiori e alle palpebre, aumento di peso e ridotta minzione.
- Circa il 20% dei pazienti manifestano proteinuria non accompagnata da altri sintomi.
- Circa il 50% dei pazienti presentano ematuria microscopica, albuminuria e glicosuria.
- Circa il 70% dei pazienti presentano pressione sanguigna e funzionalità renale nella norma alla comparsa della malattia.

Il decorso della MGN può variare. In un terzo dei casi, la malattia guarisce spontaneamente. In un terzo dei casi la malattia rimane stabile, mentre nell'altro terzo dei casi progredisce e diventa insufficienza renale cronica. L'insufficienza renale acuta è rara. Nell'insufficienza renale cronica non sottoposta ad alcuna cura, l'insufficienza renale terminale si manifesta entro 10 anni nel 15% dei pazienti; entro 10 anni in circa il 35% ed entro 15 anni in circa il 40% dei pazienti.

La glomerulonefrite membranosa primaria (pMGN) deve essere differenziata dalla nefropatia membranosa secondaria (sMGN), che è una malattia secondaria (malattia accompagnatoria) nelle infezioni, nella terapia farmacologica o nell'abuso o nel consumo di tossine, nelle collagenosi e in altre malattie autoimmuni e nei tumori. La sMGN migliora con il trattamento della malattia di base. Il trattamento della MGN come una malattia indipendente migliora la prognosi, soprattutto rispetto alla sindrome nefrotica e all'ipertonicità.

La MGN viene diagnosticata tramite biopsia renale, esame istologico o microscopia elettronica del tessuto renale. La deposizione di immunocomplessi all'esterno della membrana basale glomerulare è caratteristica della malattia.

La diagnosi sierologica dell'MGN è più rapida e meno stressante per il paziente. L'identificazione e la caratterizzazione di PLA2R (tipo M) come antigene bersaglio degli anticorpi circolanti nella MGN sono estremamente importanti nella diagnostica non invasiva. Gli autoanticorpi di classe IgG diretti contro PLA2R sono altamente specifici per la diagnosi della MGN primaria. Sono riscontrabili nel 70-75% dei pazienti. Non vengono riscontrati invece nei donatori sani o nei pazienti con il lupus o con la nefrite IgA.

I test RC-IFT ed ELISA possono essere utilizzati per la determinazione degli autoanticorpi anti PLA2R. Il test Anti-PLA2R RC-IFT usa le cellule transfettate come substrato standard. Il test Anti-PLA2R ELISA si basa sull'uso del recettore umano ricombinante purificato ottenuto da cellule transfettate. I test RC-IFT ed ELISA sono adatti per la determinazione qualitativa e quantitativa degli autoanticorpi umani di classe IgG diretti contro PLA2R. Il successo terapeutico può essere verificato studiando il valore medio del titolo degli anticorpi anti- PLA2R titolo. Un aumento, decremento o l'assenza del titolo anticorpale sono generalmente indice di un cambiamento del quadro clinico. La determinazione del titolo anticorpale ha un alto valore predittivo rispetto ad un'eventuale remissione clinica, ricaduta o per la valutazione del rischio in seguito ad un trapianto del rene.



Bibliografia

1. Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, Klein JB, Salant DJ. **M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy.** N Engl J Med 361 (2009) 11-21.
2. Beck LH Jr, Salant DJ. **Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead.** Kidney Int 77 (2010) 765-770.
3. Chen A, Frank R, Vento S, Crosby V, Chandra M, Gauthier B, Valderrama E, Trachtman H. **Idiopathic membranous nephropathy in pediatric patients: presentation, response to therapy, and long-term outcome.** BMC Nephrol 8 (2007) 11.
4. Debiec H, Martin L, Jouanneau C, Dautin G, Mesnard L, Rondeau E, Mousson C, Ronco P. **Autoantibodies Specific for the Phospholipase A2 receptor in Recurrent and De Novo Membranous Nephropathy.** Am J Transplant 11 (2011) 2144-2152.
5. Debiec H, Ronco P. **Nephrotic syndrome: A new specific test for idiopathic membranous nephropathy.** Nat Rev Nephrol 7 (2011) 496-498.
6. EUROIMMUN AG. Stöcker W, Schlumberger W, Krüger C. **Alle Beiträge zum Thema Autoimmundiagnostik.** In: Gressner A, Arndt T (Hrsg.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2012).
7. Gunnarsson I, Schlumberger* W, Rönnelid J. (*EUROIMMUN AG) **Antibodies to M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) and membranous lupus nephritis.** Am J Kidney Dis 59 (2012) 582-589.
8. Hofstra JM, Beck LH Jr, Beck DM, Wetzels JF, Salant DJ. **Anti-phospholipase A2receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy.** Clin J Am Soc Nephrol 6 (2011) 1286-1291.
9. Hofstra JM, Wetzels JF. **Anti-PLA2R antibodies in membranous nephropathy: ready for routine clinical practice?** Neth J Med 70 (2012) 109-113.
10. Fervenza FC, Sethi S, Specks U. **Idiopathic membranous nephropathy: diagnosis and treatment.** Clin J Am Soc Nephrol 3 (2008) 905-919.
11. Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Fechner* K, Helmchen U, Stahl RA. (*EUROIMMUN AG) **An immunofluorescence test for phospholipase-A2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis.** Nephrol Dial Transplant 26 (2011) 2526-2532.
12. Hoxha E, Kneißler U, Stege G, Zahner G, Thiele I, Panzer U, Harendza S, Helmchen UM, Stahl RA. **Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy.** Kidney Int (2012) Jun 6. doi: 10.1038/ki.2012.209.
13. Michel PA, Dahan K, Ancel PY, Plaisier E, Mojaat R, De Seigneux S, Daugas E, Matignon M, Mesnard L, Karras A, François H, Pardon A, Caudwell V, Debiec H, Ronco P. **Rituximab treatment for membranous nephropathy: a French clinical and serological retrospective study of 28 patients.** Nephron Extra 1 (2011) 251-261.
14. Ponticelli C, Passerini P. **Can prognostic factors assist therapeutic decisions in idiopathic membranous nephropathy?** J Nephrol 23 (2010) 156-163.
15. Ronco P, Debiec H. **Antigen identification in membranous nephropathy moves toward targeted monitoring and new therapy.** J Am Soc Nephrol 21 (2010) 564-569.
16. Ronco P, Debiec H. **Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges.** Nat Rev Nephrol 8 (2012) 203-213.



17. Ruggenti P, Cravedi P, Remuzzi G. **Latest treatment strategies for membranous nephropathy**. Expert Opin Pharmacother 8 (2007) 3159-3171.
18. Stahl R, Hoxha E, Fechner* K. (*EUROIMMUN AG) **PLA2R autoantibodies and recurrent membranous nephropathy after transplantation**. N Engl J Med 29 (2010) 496-498.
19. Stöcker* W, Fauer* H, Krause* C, Barth E, Martinetz T. (*EUROIMMUN AG) **Verfahren zur Optimierung der automatischen Fluoreszenzerkennung in der Immundiagnostik**. Deutsche Patentanmeldung (Offenlegungsschrift) DE 10 2006 027 516.0 und WO2007140952 (2006).



Anti-Recettore dell'acetilcolina ELISA (IgG)

Scheda tecnica



CODICE NO.	ANTICORPI ANTI	CLASSE IG	SUBSTRATO	FORMATO
EA 1435-9601 G	Recettori dell'acetilcolina	IgG	Ag coattati nei pozzetti della micropiastra	96 x 01 (96)

Indicazioni: Il kit ELISA permette una determinazione semiquantitativa, nel siero o plasma, degli anticorpi umani di classe IgG contro i recettori dell'acetilcolina, per supportare la diagnosi della Myasthenia gravis.

Applicazione: Il test ELISA si basa su recettori dell'acetilcolina completamente ricombinanti che contengono la subunità gamma o epsilon. ELISA rappresenta un test sensibile e specifico per la diagnosi sierologica della miastenia grave. La quantità e la miscela di recettori purificati adulti e fetali sono stati selezionati per assicurare al test un ampio intervallo di diluizione lineare.

Principio del test: Il kit contiene una micropiastra con strip dotate ciascuna di 8 pozzetti frazionabili coattati il recettore dell'acetilcolina. Nella prima reazione i campioni diluiti vengono incubati nei pozzetti. Nel caso di campioni positivi, anticorpi specifici di classe IgG si legheranno agli antigeni. Per evidenziare gli anticorpi legati, si esegue una seconda incubazione utilizzando anti IgG umane coniugate con un enzima (coniugato enzimatico) che catalizza una reazione colorimetrica.

Contenuto del test kit:

Componente	Colore	Formato	Simbolo
1. Pozzetti in micropiastra coattati con gli antigeni 12 strip ognuna con 8 pozzetti frazionabili, pronti per l'uso	---	12 x 8	STRIPS
2. Calibratore 1 , 0 nmol/l (IgG, umane)	giallo pallido	1 x 0,2 ml	CAL 1
3. Calibratore 2 , 0,25 nmol/l (IgG, umane)	giallo pallido	1 x 0,2 ml	CAL 2
4. Calibratore 3 , 0,75 nmol/l (IgG, umane)	giallo pallido	1 x 0,2 ml	CAL 3
5. Calibratore 4 , 2,5 nmol/l (IgG, umane)	giallo pallido	1 x 0,2 ml	CAL 4
6. Calibratore 5 , 8 nmol/l (IgG, umane)	giallo pallido	1 x 0,2 ml	CAL 5
7. Controllo 1 , (IgG, umane)	giallo pallido	1 x 0,2 ml	CONTROL 1
8. Controllo 2 , (IgG, umane)	giallo pallido	1 x 0,2 ml	CONTROL 2
9. Anticorpi anti IgG umane coniugati con perossidasi , pronti per l'uso	blu	1 x 12 ml	CONJUGATE
10. Tampone di lavaggio , concentrato 10x	incolore	1 x 100 ml	WASH BUFFER 10x
11. Tampone di diluizione (umano) pronto per l'uso	giallo pallido	1 x 30 ml	SAMPLE BUFFER
12. Soluzione cromogeno/substrato TMB/H ₂ O ₂ , pronta per l'uso	incolore	1 x 12 ml	SUBSTRATE
13. Soluzione di arresto 0,5 M acido solforico, pronta per l'uso	incolore	1 x 12 ml	STOP SOLUTION
14. Foglio protettivo		3 pezzi	
15. Scheda tecnica		1 libretto	
16. Certificato del controllo di qualità		1 protocollo	
LOT Descrizione del lotto	  Temperatura di conservazione Utilizzabile integro fino al		
IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro			

Gli aggiornamenti rispetto alla versione precedente sono contrassegnati in grigio.



Preparazione e stabilità dei reagenti

Nota: Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C) circa 30 minuti prima dell'uso. Dopo il primo utilizzo, i reagenti si mantengono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati ad una temperatura tra +2°C e +8°C e protetti da contaminazioni, salvo indicazioni riportate di seguito. L'incubatore per ELISA dotato di termostato dev'essere impostato a +37°C ± 1°C.

- **Pozzetti coattati:** Aprire l'involucro protettivo richiudibile in corrispondenza degli incavi posizionati sopra la chiusura a pressione. Aprire l'involucro solo quando le strip hanno raggiunto la temperatura ambiente per evitare la formazione di condensa sulla superficie dei pozzetti. Riposizionare immediatamente i pozzetti non utilizzati nell'involucro protettivo e sigillarlo utilizzando la chiusura a pressione (non rimuovere il sacchetto deumidificatore).
- Una volta aperto l'involucro, i pozzetti coattati con l'antigene possono essere conservati in un luogo asciutto ad una temperatura tra +2°C e +8°C per 4 mesi.
- **Calibratori e controlli:** I reagenti devono essere miscelati con cura prima dell'utilizzo, e maneggiati con gli stessi accorgimenti adottati per i campioni.
- **Tampone di diluizione:** Pronto all'uso. Il tampone di diluizione deve essere miscelato con cura prima dell'utilizzo.
- **Coniugato enzimatico:** Pronto all'uso. Il coniugato enzimatico deve essere miscelato con cura prima dell'utilizzo.
- **Tampone di lavaggio:** Il tampone di lavaggio è concentrato 10x. Se nel tampone concentrato si dovessero formare dei cristalli, riscaldarlo a +37°C e miscelare con cura prima di diluirlo. La quantità richiesta deve essere prelevata dal flacone usando puntali puliti e diluita con acqua deionizzata o distillata (1 parte di reagente + 9 parti di acqua distillata).
Ad esempio: Per 1 strip, diluire 5 ml di tampone concentrato in 45 ml di acqua.
Il tampone di lavaggio correttamente diluito rimane stabile per 4 settimane se correttamente utilizzato e conservato tra +2°C e +8°C.
- **Cromogeno/substrato:** Pronto all'uso. Chiudere il flacone immediatamente dopo l'uso, poiché il contenuto è sensibile alla luce. La soluzione cromogeno/substrato deve essere incolore. Non utilizzare la soluzione se presenta una colorazione blu.
- **Soluzione d'arresto:** Pronta all'uso.

Conservazione e stabilità: Il kit deve essere conservato ad una temperatura compresa tra +2°C e +8°C. Non congelare. Se mantenuti integri, tutti i componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata.

Smaltimento dei residui: I campioni, i calibratori, i controlli e le strip incubate devono essere trattati come rifiuti con rischio infettivo. Tutti i reagenti devono essere smaltiti in base alla normativa locale vigente.

Avvertenza: I calibratori ed i controlli di origine umana sono risultati negativi per HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 ed anti-HIV-2. Nonostante ciò, i materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi e maneggiati con cura. Alcuni reagenti contengono sodio azide in una concentrazione inferiore alla soglia dichiarabile. Evitare il contatto con la pelle.

Preparazione e stabilità dei campioni

Campioni: Siero umano, plasma EDTA, plasma eparinato o plasma citrato.

Stabilità: I campioni del paziente possono essere conservati tra +2°C e +8°C fino a 14 giorni. I campioni di siero fortemente emolitici o lipemici devono essere scartati.

Esecuzione: I calibratori/controlli e i campioni del paziente da analizzare vengono diluiti 1:26 con tampone campione. Esempio di una determinazione in doppio: per ogni 10 µl di campione, depositare 0,25 ml di tampone di diluizione e miscelare accuratamente (mediante Vortex).



Diluizione: Se il campione del paziente viene testato per la prima volta, procedere a diverse diluizioni. Si consiglia di procedere seguendo una serie di passaggi di diluizione predefiniti. I **campioni del paziente** devono essere diluiti esclusivamente con il tampone di diluizione fornito nel kit di analisi. L'uso di altre soluzioni per la diluizione può falsare i risultati.

Esecuzione del test

Incubazione del campione: (1° passaggio) Trasferire in ciascun pozzetto della micropiastra 100 µl di calibratori, controlli, campioni, diluiti nel tampone di diluizione. Coprire la micropiastra con il foglio protettivo fornito e incubare per 90 minuti a +37°C.

Lavaggio: Manuale: Rimuovere il foglio protettivo, svuotare i pozzetti e successivamente lavare per 3 volte, utilizzando per ciascun pozzetto 300 µl di tampone di lavaggio correttamente diluito.
Automatico: Rimuovere il foglio protettivo e lavare per 3 volte con 450 µl di tampone di lavaggio correttamente diluito (es. di impostazione del programma: TECAN Columbus Washer "Overflow Mode").

Per ogni ciclo di lavaggio, lasciare il tampone di lavaggio per 30 a 60 secondi in ciascun pozzetto, quindi svuotare i pozzetti. Dopo il lavaggio (manuale e automatico), capovolgere la piastra e rimuovere tutto il tampone di lavaggio residuo battendo vigorosamente su della carta assorbente.

Nota: I residui di liquido (>10 µl) che rimangono all'interno di ogni pozzetto dopo il lavaggio, possono interferire con il substrato e abbassare i valori di assorbanza registrati.

Un lavaggio insufficiente (meno di 3 cicli di lavaggio, volumi troppo piccoli di tampone di lavaggio o tempi di lavaggio troppo brevi) possono falsare i valori di assorbanza. Le posizioni libere della strip devono essere riempite con pozzetti vuoti dello stesso formato di quelli utilizzati per il parametro da analizzare.

Incubazione del coniugato: (2° passaggio) Depositare 100 µl di coniugato enzimatico (anticorpi anti-IgG umane coniugati con perossidasi) in ciascun pozzetto della micropiastra. Coprire la piastra e incubare per 60 minuti a +37°C.

Lavaggio: Svuotare i pozzetti. Lavare come descritto sopra.

Incubazione del substrato: (3° passaggio) Depositare 100 µl di soluzione cromogeno/substrato in ciascun pozzetto della micropiastra.
Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C; proteggere dalla luce diretta).

Arresto: Depositare 100 µl della soluzione di arresto in ciascun pozzetto della micropiastra nello stesso ordine e alla stessa velocità con cui è stata aggiunta la soluzione cromogeno/substrato.

Misurazione: La misura fotometrica dell'intensità di colore deve essere effettuata a una lunghezza d'onda di 450 nm e ad una lunghezza d'onda di riferimento tra 620 nm e 650 nm entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione d'arresto. Prima di effettuare la misurazione, agitare delicatamente la piastra per assicurare una distribuzione omogenea della soluzione.



Protocollo di lavoro

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C 1	P 2	P 10									
B	C 2	P 3	P 11									
C	C 3	P 4	P 12									
D	C 4	P 5	P 13									
E	C 5	P 6	P 14									
F	Co 1	P 7	P 15									
G	Co 2	P 8	P 16									
H	P 1	P 9	P 17									

Il protocollo riportato sopra per le strip da 1 a 3 è un esempio di **analisi quantitativa** di 17 campioni dei pazienti (da P 1 a P 17).

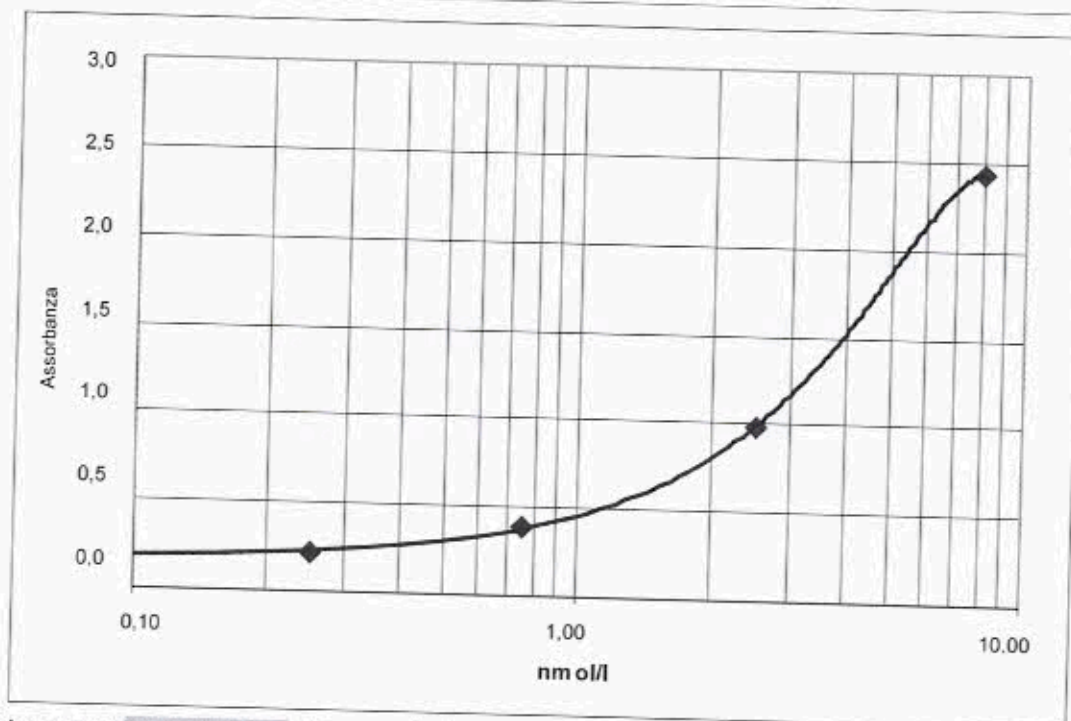
I calibratori (da C 1 a C 5), il controllo 1 (Co 1) e il controllo 2 (Co 2), ed i campioni dei pazienti sono stati incubati in singolo. L'affidabilità del test ELISA può essere migliorata duplicando le determinazioni per ciascun campione.

I pozzetti sono frazionabili e possono essere separati dalla strip. Questo permette di adattare il numero di pozzetti coattati al numero di campioni da esaminare, riducendo così al minimo lo spreco di reagenti. Sia il controllo positivo che quello negativo servono da controlli interni per valutare l'affidabilità del test. Il loro valore deve essere analizzato ad ogni esecuzione del test.

Calcolo dei risultati

Quantitativo: La curva standard, da cui può essere letta la concentrazione degli anticorpi anti recettore dell'acetilcolina, si ottiene da un tracciato point-to-point dei valori di assorbanza dei 5 sieri di calibrazione rispetto alle concentrazioni corrispondenti (lineare/logaritmico). La curva standard può essere calcolata con il computer mediante le tecniche "spline cubica" o "4-PL".

Per la corretta rappresentazione logaritmica potrebbe essere necessario impostare la concentrazione del calibratore 1 da 0 a, ad es. 0,01 nmol/l. Il grafico riportato sotto è un esempio di una tipica curva di calibrazione. Non usate questo grafico per la determinazione delle concentrazioni nei sieri dei pazienti.



Se l'assorbanza di un campione si trova al di sopra del valore del calibratore 5 (8 nmol/l), questa determinazione deve essere ripetuta in un nuovo ciclo di analisi con una nuova diluizione, ad esempio 1:10. In questo caso, il risultato espresso in nmol/l ottenuto dalla curva standard deve essere moltiplicato per un fattore di 10.

Per le determinazioni in doppio, si dovrebbe prendere la media dei due valori. Se i due valori si discostano sostanzialmente l'uno dall'altro, EUROIMMUN consiglia di ripetere il test dei campioni. Un'eventuale terapia non può essere decisa solo in base ai risultati di questo test, ma deve considerare anche i sintomi clinici e altri valori diagnostici.

Il limite superiore dei valori normali (**cut-off**) raccomandato da EUROIMMUN è di **0,5 nanomoli per litro (nmol/l)**. EUROIMMUN raccomanda di interpretare i risultati come riportato qui di seguito:

<0,40 nmol/l:	negativo
≥ da 0,40 a <0,50 nmol/l:	borderline
≥0,50 nmol/l:	positivo

Per effettuare una diagnosi corretta è importante considerare, oltre ai risultati sierologici, anche i sintomi clinici del paziente e, se disponibili, ulteriori risultati. Un risultato negativo non esclude la presenza della malattia.

Caratteristiche del test

Calibrazione: La calibrazione viene eseguita in nanomoli di bungarotossina coniugata per litro di siero (nmol/l).

Per ciascun gruppo di test eseguiti, le concentrazioni determinate per i controlli devono rientrare all'interno dei limiti indicati per lo specifico lotto. Nel kit è contenuto un certificato del controllo di qualità dove sono riportati questi valori di riferimento. Se i valori specificati per i controlli non vengono raggiunti, i risultati del test possono essere inesatti e il test deve essere ripetuto.

Antigene: Come antigene vengono utilizzati i recettori ricombinanti umani fetali e adulti dell'acetilcolina da cellule HEK.



Linearità: Tutti i sieri positivi sono lineari se diluiti con il tampone di diluizione. Un aumento delle concentrazioni anticorpali al di sopra del range di linearità comporta un effetto plateau non proporzionale. La determinazione quantitativa degli anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina è significativa solo nell'intervallo lineare tra 0,25 nmol/l a circa 6,0 nmol/l. Le misurazioni effettuate al di sopra dell'intervallo di linearità possono **falsare i risultati**.

Il range di linearità, come il range di plateau, differiscono per ognuno dei singoli campioni di siero. È quindi necessario testare la linearità di diluizione per ogni campione. La diluizione più adeguata può essere stimata in base ai valori preliminari ottenuti nel ciclo di controllo.

Limite di rilevazione: Il limite inferiore di rilevazione è definito come il valore medio ottenuto dalla somma di un campione senza analita e di un valore pari a tre volte la deviazione standard e rappresenta il più piccolo titolo anticorpale determinabile. Il limite di rilevazione del test ELISA Anti-Recettore dell'acetilcolina (IgG) è 0,11 nmol/l.

Cross-reattività: Questo test ELISA è specifico per la rilevazione degli autoanticorpi anti-recettore dell'acetilcolina umana. Non sono state osservate cross-reattività con altri autoanticorpi.

Interferenza: Sieri emolitici, lipemici ed itterici con una concentrazione fino a, rispettivamente, 2 mg/ml di emoglobina, 20 mg/ml di trigliceridi ed a 0,4 mg/ml di bilirubina, non hanno mostrato alcun effetto sui risultati analitici di questo test.

Riproducibilità: La riproducibilità del test è stata analizzata determinando il coefficiente di variazione intra- e inter-saggio (CV) utilizzando 3 campioni. I CV intra-saggio sono stati calcolati sulla base di 15 determinazioni e i CV inter-saggio su 3 determinazioni eseguite in 5 differenti sedute.

Variazione intra-saggio, n = 15		
Campione	Media (nmol/l)	CV (%)
1	0,843	7,1
2	2,176	6,6
3	5,349	6,1

Variazione inter-saggio, n = 3 x 5		
Campione	Media (nmol/l)	CV (%)
1	0,914	8,9
2	2,329	10,9
3	5,562	6,8

Specificità e sensibilità: Sono stati analizzati 90 campioni di pazienti precaratterizzati (origine: Europa; metodo di riferimento: EUROIMMUN Anti-recettore dell'acetilcolina (AChR) RIA) mediante il test ELISA Anti-recettore dell'acetilcolina (IgG). La sensibilità è risultata pari a 96%, con una specificità del 97,1%. I risultati borderline sono stati esclusi dal calcolo.

n = 90		EUROIMMUN Anti-recettore dell'acetilcolina (AChR) RIA		
		positivo	borderline	negativo
EUROIMMUN ELISA Anti-recettore dell'acetilcolina (IgG)	positivo	48	1	1
	borderline	1	0	1
	negativo	2	2	34

Range di riferimento: I campioni di 151 donatori sani hanno dimostrato una concentrazione di anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina inferiore a 0,86 nmol/l, con una media di 0,18 nmol/l e una deviazione standard di 0,18 nmol/l. Il 95° percentile è stato determinato a 0,49 nmol/l.

Significato clinico

Il test basato su recettori dell'acetilcolina è utile per la rilevazione sierologica degli autoanticorpi diretti contro i recettori dell'acetilcolina (AChR). Il test è altamente sensibile e specifico e contribuisce in modo rilevante alla diagnostica sierologica della miastenia grave (MG), ed è un utile ausilio per diagnosticare in modo definitivo la MG.



Nella MG, gli autoanticorpi diretti contro AChR nelle placche terminali motorie sono la causa di disfunzioni della trasmissione neuromuscolare. Il risultato è la debolezza dei muscoli vitali, una **condizione** potenzialmente fatale. Se la diagnosi viene effettuata in uno stadio iniziale, è possibile avviare un trattamento salvavita. Si distinguono diverse forme di MG. Esse comprendono le forme acquisite di MG, vale a dire la MG generalizzata e la MG con sindromi puramente oculari, e le forme genetiche.

Si stima che la prevalenza della MG è tra 40 a 125 casi ogni milione di persone in Europa, e tra 50 a 200 negli Stati Uniti. La MG si può manifestare dalla prima infanzia all'età avanzata. Vi è maggiore probabilità di contrarre tale malattia per le donne d'età compresa tra i 20 e 30 anni e per gli uomini con età superiore ai 50 anni.

Per la diagnosi della MG sono disponibili diversi test sierologici. Inizialmente può essere effettuato un test dell'inibitore dell'acetilcolina. Se i risultati delle analisi rientrano nei livelli normali, si dovrà procedere alla determinazione degli autoanticorpi anti AChR. La soluzione ottimale per questo tipo di indagine è fornita dal test ELISA Anti-Recettore dell'acetilcolina e dal RIA Anti-Recettore dell'acetilcolina. Queste analisi sono altamente specifiche e sensibili, e forniscono i risultati migliori e più affidabili per la diagnosi della MG e per monitorare il decorso della malattia.

Quasi il 90% dei pazienti affetti da MG generalizzata acquisita manifesta gli autoanticorpi anti AChR. Nei pazienti affetti dalla forma esclusivamente oculare di MG, tali autoanticorpi sono rilevabili in circa il 60% dei casi. Gli autoanticorpi diretti contro AChR non sono presenti nei pazienti con forme genetiche di MG (circa il 5% a 10% di tutti i casi). Dato che l'assenza degli autoanticorpi anti AChR non consente di escludere del tutto la presenza di MG, nei casi sospetti è necessario procedere ad una elettromiografia (EMG) per confermare o escludere la malattia. Raramente, gli autoanticorpi anti AChR si manifestano senza che vi siano sintomi clinici della MG: in questo caso, indicano comunque un alto rischio di insorgenza della malattia. Questi casi si associano spesso ad altre malattie autoimmuni. Il decorso della MG può essere monitorata mediante la determinazione periodica dei titoli anticorpali degli anti-AChR.

Bibliografia

1. De Baets M, Stassen MH. **The role of antibodies in myasthenia gravis.** J. Neurol. Sci 202 (2002) 5-11.
2. Klooster R, Plomp JJ, Huijbers MG, Niks EH, Straasheijm KR, Detmers FJ, Hermans PW, Sleijpen K, Verrips A, Losen M, Martinez-Martinez P, De Baets MH, van der Maarel SM, Verschuuren JJ. **Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice.** Brain 135 (2012) 1081-1101.
3. Leite MI, Jacob S, Viegas S, Cossins J, Clover L, Morgan BP, Beeson D, Willcox N, Vincent A. **IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis.** Brain 131 (2008) 1940-1952.
4. Leite MI, Waters P, Vincent A. **Diagnostic use of autoantibodies in myasthenia gravis.** Autoimmunity 43 (2010) 371-379.
5. McConville J, Vincent A. **Diseases of the neuromuscular junction.** Curr. Opin. Pharmacol 2 (2002) 296-301.
6. Meriggioli MN, Sanders DB. **Muscle autoantibodies in myasthenia gravis: beyond diagnosis?** Expert Rev Clin Immunol 8 (2012) 427-438.
7. Niks EH, Kuks JB, Wokke JH, Veldman H, Bakker E, Verschuuren JJ, Plomp JJ. **Pre- and post-synaptic neuromuscular junction abnormalities in musk myasthenia.** Muscle Nerve 42 (2010) 283-288.
8. Phillips LH 2nd. **The epidemiology of myasthenia gravis.** Ann N Y Acad Sci 998 (2003) 407-412.

9. EUROIMMUN AG. Saschenbrecker S, Rentzsch K, Probst C, Komorowski L, Stöcker W. **Autoantikörperdiagnostik in der Neurologie mittels nativer und rekombinanter Antigensubstrate.** Der Nervenarzt 84 (2013) 471-476.
10. EUROIMMUN AG. Saschenbrecker S, Rentzsch K, Probst C, Komorowski L, Stöcker W. **Antineuronale Autantikörper: Klinische Bedeutung und Nachweismethoden.** Med Welt 64 (2013) 21-29.
11. Vrolix K, Fraussen J, Molenaar PC, Losen M, Somers V, Stinissen P, De Baets MH, Martínez-Martínez P. **The auto-antigen repertoire in myasthenia gravis.** Autoimmunity 43 (2010) 380-400.
12. EUROIMMUN AG. Westermann J, Schütt A, Probst C, Schlumberger W, Stöcker W. **Autoantibodies against acetylcholine receptors in myasthenia gravis: RIA based on a new source for the epsilon containing receptor.** 8. International Congress on Autoimmunity, Granada, Spanien (2012).



Instructions for Use



Anti-Insulin ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of IgG class autoantibodies against bovine, porcine and recombinant human insulin in human serum or plasma



EIA-3608



96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg
Telefon: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49-(0)6421-1700 50
Internet: www.drg-diagnostics.de
E-Mail: drg@drg-diagnostics.de

DRG 

DRG International, Inc.
USA
Telephone: (908) 233-2079
Fax: (908) 233-0758
E-Mail: corp@drg-international.com

Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella dei Contenuti / Tabla de Contenidos

1	NAME AND INTENDED USE	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST	3
3	SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	3
4	CONTENTS OF THE KIT	4
5	MATERIALS REQUIRED	5
6	SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING	5
7	STORAGE AND STABILITY	5
8	PROCEDURAL NOTES	5
9	WARNINGS AND PRECAUTIONS	6
10	PREPARATION OF REAGENTS	6
11	PREPARATION OF SAMPLES	6
12	TEST PROCEDURE	7
13	VALIDATION	7
14	CALCULATION OF RESULTS	7
15	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
16	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	9
1	ZWECKBESTIMMUNG	10
2	TESTPRINZIP	10
3	BESCHREIBUNG	10
4	LIEFERUMFANG	11
5	ERFORDERLICHE AUSRÜSTUNG	11
6	PROBENENTNAHME UND -LAGERUNG	12
7	LAGERUNG UND HALTBARKEIT	12
8	ALLGEMEINE HINWEISE	12
9	HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	13
10	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	13
11	PROBENVORBEREITUNG	13
12	TESTDURCHFÜHRUNG	14
13	VALIDIERUNG	14
14	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	14
15	TESTCHARAKTERISTIKA	15
16	GRENZEN DES VERFAHRENS	16

1	BREVE DESCRIZIONE	17
2	METODOLOGIA	17
3	RIASSUNTO E DESCRIZIONE DEL TEST	17
4	CONTENUTO DEL KIT	17
5	MATERIALE NECESSARIO	18
6	RACCOLTA, CONSERVAZIONE, MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI	18
7	CONSERVAZIONE E STABILITÀ	18
8	AVVERTENZE OPERATIVE	18
9	INDICAZIONI E MISURE PRECAUZIONALI	19
10	PREPARAZIONE DEI REAGENTI	19
11	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	19
12	ESECUZIONE DEL TEST	20
13	CONVALIDA	20
14	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	20
15	CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO	21
16	LIMITI DEL PROCEDIMENTO	22
1	DESCRIPCIÓN BREVE	23
2	METODOLOGÍA	23
3	RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA	23
4	CONTENIDO DEL KIT	23
5	EQUIPOS REQUERIDOS DE LABORATORIO	24
6	RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACION	24
7	CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD	24
8	NOTAS TÉCNICAS	24
9	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	25
10	PREPARACIÓN DE REACTIVOS	25
11	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	25
12	PROCEDIMIENTO	26
13	VALIDACIÓN	26
14	INTERPRETACION DE RESULTADOS	26
15	LOS CARACTERISTICAS DE FUNCIONAMIENTO	27
16	LÍMITE DEL PROCEDIMIENTO	28
17	REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI / BIBLIOGRAFÍA	29
	SYMBOLS USED WITH DRG ASSAYS	30

1 NAME AND INTENDED USE

Anti-Insulin ELISA is a test system for the quantitative measurement IgG class autoantibodies against bovine, porcine and recombinant human insulin in human serum or plasma.

This product is intended for professional in vitro diagnostic use only.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

A mixture of highly purified preparations of bovine, porcine and recombinant human insulin is bound to microwells. The determination is based on an indirect enzyme linked immune reaction with the following steps:

Specific antibodies in the patient sample bind to the antigen coated on the surface of the reaction wells. After incubation, a washing step removes unbound and unspecifically bound serum or plasma components.

Subsequently added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen-complexes. After incubation, a second washing step removes unbound enzyme conjugate. After addition of substrate solution the bound enzyme conjugate hydrolyses the substrate forming a blue coloured product. Addition of an acid stops the reaction generating a yellow end-product.

The intensity of the yellow colour correlates with the concentration of the antibody-antigen-complex and can be measured photometrically at 450 nm.

3 SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Type I Diabetes is mainly characterised by limited or fully missing secretion of the hormone insulin. Morphological studies demonstrated a destruction of the beta cells of the so-called Langerhans cells (islet cells) in type I diabetics.

Numerous researchers described the appearance of antibodies directed against the islet cells and insulin as the causal reason for the onset of the disease.

Anti-Insulin antibodies are found in 37 percent of patients with newly detected Type I Diabetes, in 4 percent of their relatives of the first degree and in up to 1.5 percent of healthy controls. A positive correlation between the appearance of anti-Insulin and anti-islet cell antibodies has been reported.

Anti-Insulin autoantibodies may be detected several months and in some cases years before the onset of the fully clinical manifestation of the diseases. Occasionally also autoantibodies to Pro-Insulin may appear.

These "true" anti-Insulin autoantibodies directed against endogenous insulin have to be distinguished from those autoantibodies which are developed in insulin dependent diabetics undergoing therapy with insulin preparations of animal origin. In fact the latter have to be referred to side effects. These side effects may occur as local reactions of the skin by development of insulin-specific autoantibodies. These autoantibodies are causing the formation of an insulin depot and they may simulate a resistance against the hormonal treatment with animal insulin.

Additionally other immunological phenomenon have been reported for Type I diabetics. A lot of other autoantibody specificities have been detected in those patients, too, but these antibodies must not cause additional autoimmune phenomenon.

4 CONTENTS OF THE KIT

Symbols		Sufficient for 96 determinations
MICROPLATE	1	One divisible microplate consisting of 12 modules of 8 wells each. Ready to use.
CALIBRATOR A	1x 1.5 mL	Calibrator A 0 U/mL, containing serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR B	1x 1.5 mL	Calibrator B 6.3U/mL, containing insulin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR C	1x 1.5 mL	Calibrator C 12.5 U/mL, containing insulin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR D	1x 1.5 mL	Calibrator D 25 U/mL, containing insulin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR E	1x 1.5 mL	Calibrator E 50 U/mL, containing insulin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR F	1x 1.5 mL	Calibrator F 100 U/mL, containing insulin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use.
CONTROL 1 +	1x 1.5 mL	Control positive , containing insulin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.
CONTROL 2 -	1x 1.5 mL	Control negative , containing insulin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.
DILUENT	20 mL	Sample Buffer , containing PBS, BSA, detergent, preservative sodium azide 0.09%, yellow, concentrate (5 x).
CONJUGATE	15 mL	Enzyme Conjugate ; containing anti-human IgG antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative Proclin 0.05%, light red. Ready to use.
TMB	15 mL	TMB Substrate ; containing 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin, colourless. Ready to use.
STOP	15 mL	Stop Solution ; contains acid. Ready to use.
WASH	20 mL	Wash Buffer , containing Tris, detergent, preservative sodium azide 0.09%; 50X conc.
	1	Instruction for Use
	1	Certificate of Analysis

5 MATERIALS REQUIRED

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm; optional: reference filter at 620 nm
- Data reduction software
- Multi-channel dispenser or repeatable pipette for 100 µL
- Vortex mixer
- Pipettes for 10 µL, 100 µL and 1000 µL
- Laboratory timing device
- Distilled or deionised water
- Measuring cylinder for 1000 mL and 100 mL
- Plastic container for storage of the wash solution

This ELISA is suitable for use on open automated ELISA processors. Each assay has to be validated on the respective automated system. Detailed information is provided upon request.

6 SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

- Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
- Allow blood to clot and separate the serum or plasma by centrifugation.
- Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia should be avoided, but does not interfere with this assay.
- Specimens may be refrigerated at 2 °C - 8 °C for up to five days or stored at -20 °C up to six months.
- Avoid repetitive freezing and thawing of serum or plasma samples. This may result in variable loss of antibody activity.
- Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

7 STORAGE AND STABILITY

- Store test kit at 2 °C - 8 °C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store microplate sealed and desiccated in the clip bag provided.
- Shelf life of the unopened test kit is 18 months from day of production. Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.
- Diluted Wash Buffer and Sample Buffer are stable for at least 30 days when stored at 2 °C - 8 °C. We recommend consumption on the same day.

8 PROCEDURAL NOTES

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- Do not interchange kit components from different lots and products.
- All materials must be at room temperature (20 °C - 28 °C) prior to use.
- Prepare all reagents and samples. Once started, perform the test without interruption.
- Double determinations may be done. By this means pipetting errors may become obvious.
- Perform the assay steps only in the order indicated.
- Always use fresh sample dilutions.
- Pipette all reagents and samples into the bottom of the wells.
- To avoid carryover or contamination, change the pipette tip between samples and different kit controls.
- Wash microwells thoroughly and remove the last droplets of wash buffer.
- All incubation steps must be accurately timed.
- Do not re-use microplate wells.

9 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- All reagents of this kit are intended for professional in vitro diagnostic use only.
- Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2 by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.
- Bovine serum albumin (BSA) used in components has been tested for BSE and found negative.
- Avoid contact with the substrate TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine).
- Stop solution contains acid, classification is non-hazardous. Avoid contact with skin.
- Control, sample buffer and wash buffer contain sodium azide 0.09% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
- Enzyme conjugate contains ProClin 300 0.05% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.

During handling of all reagents, controls and serum samples observe the existing regulations for laboratory safety regulations and good laboratory practice:

- First aid measures:
In case of skin contact, immediately wash thoroughly with water and soap. Remove contaminated clothing and shoes and wash before reuse. If system fluid comes into contact with skin, wash thoroughly with water. After contact with the eyes carefully rinse the opened eye with running water for at least 10 minutes. Get medical attention if necessary.
- Personal precautions, protective equipment and emergency procedures:
Observe laboratory safety regulations. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled. When spilled, absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal.
- Exposure controls / personal protection:
Wear protective gloves of nitril rubber or natural latex. Wear protective glasses. Used according to intended use no dangerous reactions known.
- Conditions to avoid:
Since substrate solution is light-sensitive. Store in the dark.
- For disposal of laboratory waste the national or regional legislation has to be observed.

Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying control sera.

10 PREPARATION OF REAGENTS

Wash Buffer (WASH)

Dilute the contents of one vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled or deionised water to a final volume of 1000 mL prior to use.

Sample Buffer (DILUENT)

Prior to use dilute the contents (20 mL) of one vial of sample buffer 5x concentrate with distilled or deionised water to a final volume of 100 mL.

11 PREPARATION OF SAMPLES

Dilute all patient samples 1:100 with sample buffer prior to use in the assay

Put 990 µL of prediluted sample buffer in a polystyrene tube and add 10 µL of sample. Mix well.

Note: Calibrators / Controls are ready to use and need not be diluted.

12 TEST PROCEDURE

Prepare enough microplate modules for all calibrators / controls and patient samples.

1. Pipette **100 µL** of calibrators, controls and prediluted patient samples into the wells.
2. Incubate for **30 minutes** at room temperature (20 °C - 28 °C).
3. Discard the contents of the microwells and **wash 3 times with 300 µL** of wash solution.
4. Dispense **100 µL** of enzyme conjugate into each well.
5. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and **wash 3 times with 300 µL** of wash solution.
7. Dispense **100 µL** of TMB substrate solution into each well.
8. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
9. Add **100 µL** of stop solution to each well of the modules.
10. Incubate for **5 minutes** at room temperature.
11. **Read** the optical density at 450 nm (reference 600-690 nm) and calculate the results. The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read during this time.

Example for a pipetting scheme:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... patient sample, A-F Calibrators, C+, C- controls

13 VALIDATION

Test results are valid if the optical densities at 450 nm for calibrators / controls and the results for controls comply with the reference ranges indicated on the Certificate of Analysis enclosed in each test kit.

If these quality control criteria are not met the assay run is invalid and should be repeated.

14 CALCULATION OF RESULTS

For quantitative results plot the optical density of each calibrator versus the calibrator concentration to create a calibration curve. The concentration of patient samples may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

Using data reduction software a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

15 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

15.1 Calibration

This assay system is calibrated in relative arbitrary units, since no international reference preparation is available for this assay.

15.2 Measuring range

The calculation range of this ELISA assay is 0 - 100 U/mL

15.3 Expected values

In a normal range study with samples from healthy blood donors the following ranges have been established with this ELISA assay:

Cut-off : 10 U/mL

15.4 Interpretation of results

Negative: < 10 U/mL

Positive: ≥ 10 U/mL

15.5 Linearity

Patient samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in sample buffer to demonstrate the dynamic range of the assay and the upper / lower end of linearity. Activity for each dilution was calculated from the calibration curve using a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates.

Sample	Dilution	Observed [U/mL]	Expected [U/mL]	O/E [%]
1	1:100	77.6	77.6	100
	1:200	41.7	38.8	107
	1:400	21.1	19.4	109
	1:800	10.3	9.7	106
	1:1600	4.7	4.9	96
2	1:100	100.7	100.7	100
	1:200	50.7	50.4	101
	1:400	23.7	25.2	94
	1:800	11.1	12.6	88
	1:1600	5.3	6.3	84

15.6 Limit of detection

Functional sensitivity was determined to be: 0.5 U/mL

15.7 Reproducibility

Intra-assay precision:

Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Inter-assay precision:

Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 6 determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

Intra-Assay		
Sample	Mean [U/mL]	CV [%]
1	11.2	2.5
2	27.6	2.9
3	59.7	4.0

Inter-Assay		
Sample	Mean [U/mL]	CV [%]
1	11.6	6.0
2	31.2	5.2
3	69.5	4.3

15.8 Interfering substances

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dL) or lipemic (up to 3 g/dL triglycerides) sera or plasma, or bilirubin (up to 40 mg/dL) containing sera or plasma.

Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, Heparin).

However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

15.9 Study results

Study population	n	n Pos	[%]
Diabetes mellitus Typ I	100	72	72.0
Normal human sera	160	2	1.3

		Clinical Diagnosis	
		Pos	Neg
EIA-3608	Pos	72	2
	Neg	28	158
		100	160
		260	

Sensitivity: 72.0 %

Specificity: 98.8 %

Overall agreement: 88.5 %

16 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

The above pathological and normal reference ranges for antibodies in patient samples should be regarded as recommendations only. Each laboratory should establish its own ranges according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Anti-Insulin ELISA ist ein Testsystem für die quantitative Bestimmung von IgG Antikörpern gegen Insulin in humanem Serum oder Plasma.

Dieses Produkt ist ausschließlich für die professionelle Anwendung durch Fachpersonal in der in vitro Diagnostik bestimmt.

2 TESTPRINZIP

Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sind beschichtet mit hochgereinigtem Insulin.

Die Bestimmung basiert auf dem Prinzip eines indirekten ELISA mit den folgenden Schritten:

Spezifische Antikörper, die in der zu untersuchenden Probe enthalten sind, binden an die Antigene, mit denen die Oberflächen der Reaktionskavitäten beschichtet sind. Ein auf die anschließende Inkubation folgender Waschschritt entfernt alle nicht gebundenen oder unspezifisch gebundenen Moleküle. Das zugegebene Enzymkonjugat bindet an die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach Inkubation wird in einem zweiten Waschschritt überschüssiges Konjugat entfernt. Das Enzymkonjugat setzt zugefügtes Substrat in ein blaugefärbtes Produkt um. Durch Zugabe von Säure entsteht ein gelbgefärbtes Endprodukt. Die Intensität der Gelbfärbung korreliert mit der Konzentration an Antigen-Antikörper-Komplexen und wird über ein optisches Modul bei 450 nm gemessen.

3 BESCHREIBUNG

Der Diabetes mellitus entsteht durch einen Fehlfunktion im Glukosestoffwechsel, bedingt durch eine verminderte oder fehlende Sekretion von Insulin, wobei man die Krankheit in zwei Haupttypen untergliedert. Der Typ I (TI-DM) tritt fast immer vor dem 30. Lebensjahr auf und führt zu einer vollständigen Abhängigkeit von äußerer Insulinzufuhr. Der Typ II ist eine Krankheit des höheren Lebensalters und geht in der Regel mit Übergewicht einher. Letzterer ist jedoch durch oral verabreichte Medikamente sowie durch richtige Ernährung unter Kontrolle zu bringen.

Der TI-DM hingegen stellt eine Autoimmunerkrankung dar, ausgelöst durch Autoantikörper gegen die Inselzellen des Pankreas und gegen Insulin selbst. Antikörper gegen tierische Insuline gelten im Gegensatz zu Antikörpern gegen humanes Insulin nicht als Autoantikörper. Diese Antikörper sind die Ursache für die Bildung von Insulindepots und sie simulieren eine Insulinresistenz gegenüber der hormonellen Behandlung mit tierischem Insulin. In Folge dieses Insulinmangels entsteht eine Hyperglykämie, welche wiederum zu Störungen im Lipidstoffwechsel und bei der Glykosylierung verschiedener Gewebe führt. Diese Veränderungen sind die Ursache vieler Komplikationen im Spätstadium des TI-DM. Kurzfristig tritt vermehrt Zucker aus dem Blut in den Urin über, was zu einer erhöhten Urinmenge, verstärktem Durst und Flüssigkeitsmangel führt. Unter diesen Umständen kann der Patient in ein Koma fallen und entweder durch die unmittelbaren osmotischen Wirkungen des Zuckers oder durch die, aus anderen resultierenden Stoffwechseldefekten entstehende Ketoazidose sterben.

Die langfristigen Effekte des TI-DM liegen in einer Verdickung der Basalmembran in den Blutgefäßen mit nachfolgender Veränderung in Netzhaut und Nieren, einer verstärkten Kalzifizierung der Gefäße mit nachfolgenden Herzinfarkten und Schlaganfällen, Nervenschäden mit Taubheitsgefühlen in Händen und Füßen sowie Zuckerablagerungen in der Augenlinse, die zu Katarakten führt.

4 LIEFERUMFANG

Symbol		Ausreichend für 96 Bestimmungen
MICROPLATE	1	Eine Mikrotiterplatte mit 12 Modulen mit jeweils 8 Kavitäten. Gebrauchsfertig.
CALIBRATOR A	1x 1.5 mL	Standard A 0 U/mL, enthält Serum/Puffer Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN ₃ 0,09%). Gebrauchsfertig.
CALIBRATOR B	1x 1.5 mL	Standard B 6,3 U/mL, enthält Insulin-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN ₃ 0,09%). Gebrauchsfertig.
CALIBRATOR C	1x 1.5 mL	Standard C 12,5 U/mL, enthält Insulin-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN ₃ 0,09%). Gebrauchsfertig.
CALIBRATOR D	1x 1.5 mL	Standard D 25 U/mL, enthält Insulin-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN ₃ 0,09%). Gebrauchsfertig.
CALIBRATOR E	1x 1.5 mL	Standard E 50 U/mL, enthält Insulin-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN ₃ 0,09%). Gebrauchsfertig.
CALIBRATOR F	1x 1.5 mL	Standard F 100 U/mL, enthält Insulin-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN ₃ 0,09%). Gebrauchsfertig.
CONTROL 1 +	1x 1.5 mL	Positive Kontrolle , enthält Insulin-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN ₃ 0,09%). Gebrauchsfertig. Konzentrationsangabe im Analysenzertifikat.
CONTROL 2 -	1x 1.5 mL	Negative Kontrolle , enthält Insulin-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN ₃ 0,09%). Gebrauchsfertig. Konzentrationsangabe im Analysenzertifikat.
DILUENT	20 mL	Probenpuffer , gelb; enthält PBS, BSA, Detergens, Konservierungsmittel NaN ₃ 0,09%. Konzentrat 5x.
CONJUGATE	15 mL	Enzymkonjugat ; rosa, enthält anti-human IgG-Antikörper, POD markiert, in PBS, BSA, Detergens, Konservierungsmittel Proclin 0,05%. Gebrauchsfertig.
TMB	15 mL	TMB-Substrat ; enthält 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin. Gebrauchsfertig.
STOP	15 mL	Stopplösung ; enthält Säure. Gebrauchsfertig.
WASH	20 mL	Waschpuffer ; enthält Tris, Detergens, NaN ₃ 0,09%. Konzentrat 50x.
	1	Gebrauchsanweisung
	1	Qualitätskontrollzertifikat

5 ERFORDERLICHE AUSRÜSTUNG

- Plattenphotometer mit einem optischen Filter der Messwellenlänge 450 nm; Bichromatische Messung mit Referenzwellenlänge 600-690 nm wird empfohlen.
- Auswertesoftware
- Mehrkanalpipette oder Multipette
- Vortex-Mixer
- Mikropipetten mit Einmalspitzen für 10 µL, 100 µL, 1000 µL
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- Messzylinder für 100 mL und 1000 mL
- Gefäß zur Aufbewahrung der Waschlösung

Automation:

Dieser ELISA Test kann auf automatisierten Systemen angewendet werden. Die Anwendung ist auf dem jeweiligen Automaten zu validieren. Weitere Informationen auf Anfrage.

6 PROBENENTNAHME UND -LAGERUNG

- Blutproben sind nach den geltenden Verfahren zu gewinnen.
- Blut gerinnen lassen und Serum durch Zentrifugation gewinnen.
- Proben sollten klar und nicht hämolytisch sein. Die Verwendung hämolytischer oder lipämischer Proben sollte vermieden werden, stört diesen Test jedoch nicht.
- Serum- und Plasmaproben können gekühlt bei 2 °C - 8 °C bis zu 5 Tage aufbewahrt werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtigt, sollten die Proben aliquotiert und bei -20 °C tiefgefroren werden.
- Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden! Verlust an Antikörperaktivität möglich.
- Die Verwendung hitzeinaktivierter Seren wird nicht empfohlen.

7 LAGERUNG UND HALTBARKEIT

- Lagerung der Testpackung bei 2 °C - 8 °C im Dunkeln.
- Reagenzien während der Lagerung und Anwendung nicht Hitze, Sonne oder starkem Licht aussetzen.
- Mikrotiterplatte versiegelt und mit Trockenmittel versehen im mitgelieferten Klippbeutel lagern.
- Die Haltbarkeit der nicht-geöffneten Testpackung beträgt 18 Monate vom Tag der Produktion an. Die nichtgeöffneten Reagenzien sind bis zum Ablaufdatum der Testpackung stabil. Siehe Etikett der einzelnen Charge.
- Verdünnter Waschpuffer und verdünnter Probenpuffer sind bei 2 °C - 8 °C mindestens 30 Tage stabil. Wir empfehlen die Gebrauchslösungen am selben Tag zu verbrauchen.

8 ALLGEMEINE HINWEISE

- Komponenten dieses Tests nach Ablauf der Haltbarkeit nicht mehr benutzen.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Produkte dürfen nicht ausgetauscht werden.
- Alle Materialien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) bringen.
- Proben und Reagenzien vorbereiten. Sobald der Test gestartet ist, ohne Unterbrechung abarbeiten.
- Doppelbestimmungen können durchgeführt werden. Dadurch können Pipettierfehler offensichtlich werden.
- Reihenfolge der Arbeitsschritte genau einhalten.
- Immer frische Probenverdünnungen verwenden.
- Alle Reagenzien und Proben auf den Boden der Kavitäten pipettieren.
- Um Verschleppungen zu vermeiden, Pipettenspitze wechseln zwischen den einzelnen Proben / Kontrollen.
- Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sorgfältig waschen und letzte Reste Waschpuffer entfernen.
- Alle Inkubationszeiten genau einhalten.
- Die Kavitäten der Mikrotiterplatten sind nicht wiederverwendbar.

9 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle Reagenzien dieser Testpackung sind ausschließlich zur Anwendung durch Fachpersonal in der in vitro Diagnostik bestimmt.
- Komponenten, die Humanserum enthalten, wurden mit FDA anerkannten Methoden auf HBsAg, HCV, HIV1 und HIV2 geprüft und für negativ befunden. Da kein Test die Abwesenheit von HBsAg, HCV, HIV1 und HIV2 garantieren kann, empfehlen wir, alle Serum enthaltenden Bestandteile der Testpackung wie potentiell infektiöses Material zu handhaben.
- Rinderserumalbumin (BSA), das in den Komponenten enthalten ist, wurde auf BSE geprüft und für negativ befunden.
- Kontakt mit dem Enzymsubstrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) vermeiden.
- Die Stopplösung enthält Säure. Diese Konzentration ist als nicht gefährlich eingestuft. Hautkontakt vermeiden.
- Kontrollen, Probenpuffer und Waschpuffer enthalten Natriumazid 0,09% als Konservierungsmittel. Diese Konzentration ist nicht als gefährlich eingestuft.
- Das Enzymkonjugat enthält 0,05% Proclin 300 als Konservierungsmittel. Diese Konzentration ist als nicht gefährlich eingestuft.

Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten:

- **Erste-Hilfe-Maßnahmen:**
Bei Hautkontakt sofort gründlich mit Wasser und Seife waschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe ablegen und vor der Wiederverwendung waschen. Sollte die Stopplösung in Kontakt mit der Haut kommen, gründlich mit Wasser waschen. Nach Augenkontakt das Auge mit weit gespreizten Lidern mindestens 10 Minuten unter fließendem Wasser spülen. Bei Bedarf Arzt aufsuchen.
- **Maßnahmen bei unbeabsichtigter Freisetzung:**
Sicherheitsrichtlinien der Guten Laborpraxis beachten. Kontakt mit der Haut und den Augen vermeiden. Nicht verschlucken. Nicht mit dem Mund pipettieren. In Bereichen, in denen Proben oder Bestandteile des Produktes gehandhabt werden, nicht essen, trinken, rauchen oder schminken. Verschüttungen mit inertem Material aufnehmen und einer geeigneten Abfallentsorgung zuführen.
- **Persönliche Schutzausrüstung:**
Schutzhandschuhe aus Nitril oder Latex tragen. Schutzbrille tragen. Bei zweckbestimmter Anwendung sind keine gefährlichen Reaktionen bekannt.
- **Zu vermeidende Bedingungen:**
Da das TMB Substrat lichtempfindlich ist, im Dunkeln lagern.
- **Abfälle** sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.

Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollseren sollten beachtet werden.

10 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Wash Buffer (WASH)

Vor Gebrauch den Inhalt des Waschpuffer-Konzentrates (50x) mit destilliertem oder vollentsalztem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 mL verdünnen.

Sample Buffer (DILUENT)

Vor Gebrauch den Inhalt (20 mL) einer Flasche Probenpuffer 5x-Konzentrat durch Zugabe von destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 100 mL verdünnen.

11 PROBENVORBEREITUNG

Patientenproben **1:100** verdünnen:

990 µL verdünnten Probenpuffer im Polystyrolröhrchen vorlegen und 10 µL Probe zugeben. Mischen.

Beachten: Standards und Kontrollen sind bereits gebrauchsfertig.

12 TESTDURCHFÜHRUNG

Ausreichend Mikrotiterplatten-Module zum Ansatz von Standardreihe, Kontrollen und Patientenproben vorbereiten.

1. Jeweils **100 µL** der Standards, Kontrollen und vorverdünnten Patientenproben in die Kavitäten pipettieren.
2. **30 Minuten** bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
3. Kavitäten entleeren und **3-mal waschen** mit jeweils **300 µL** Waschpuffer.
4. Jeweils **100 µL** Enzymkonjugat in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettieren.
5. **15 Minuten** bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
6. Kavitäten entleeren und **3-mal waschen** mit jeweils **300 µL** Waschpuffer.
7. Jeweils **100 µL** TMB-Substrat in die Kavitäten pipettieren.
8. **15 Minuten** bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
9. Jeweils **100 µL** Stopplösung in jede Kavität dazu pipettieren.
10. **5 Minuten** bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
11. Optische Dichte bei 450 nm (Referenz 600-690 nm) messen und die Ergebnisse berechnen. Die Farbentwicklung ist mindestens 30 Minuten stabil. Innerhalb dieser Zeit optische Dichte messen.

Beispiel für ein Pippettierschema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... Probe, A-F Standard, C+, C- Kontrolle

13 VALIDIERUNG

Dieser Test ist nur gültig, wenn die bei 450 nm gemessenen optischen Dichten der Standards und Kontrollen, sowie die Testergebnisse der Kontrollen mit den Referenzbereichen des Analysenzertifikates übereinstimmen.

Trifft eine dieser Qualitätskriterien nicht zu, sind die Testergebnisse ungültig und der Test sollte wiederholt werden.

14 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Für quantitative Resultate erstellt man eine Standardkurve durch Auftragen der gemessenen optischen Dichte der Standards gegen die Standardkonzentrationen. Die Probenkonzentration kann durch Interpolation auf der Standardkurve abgelesen werden.

Eine Auswertesoftware mit 4-Parameter-Kurvenanpassung und lin-log Koordinaten für optische Dichte und Konzentration ist die Methode der Wahl.

15 TESTCHARAKTERISTIKA

15.1 Kalibrierung

Da es für diesen Assay keinen internationalen Standard gibt, ist das quantitative Messsystem in relativen Einheiten kalibriert.

15.2 Messbereich

Der Messbereich dieses ELISAs beträgt: 0 - 100 U/mL

15.3 Normalwerte

Im Rahmen einer Normbereichsstudie mit Proben von gesunden Blutspendern wurden für diesen ELISA die folgenden Werte ermittelt:

Cut-off: 10 U/mL

15.4 Interpretation der Ergebnisse

Negativ: < 10 U/mL

Positiv: ≥ 10 U/mL

15.5 Linearität

Patientenproben mit hoher spezifischer Antikörperkonzentration wurden in Probenpuffer linear verdünnt, um den dynamischen Messbereich des Assays darzustellen. Die Antikörperaktivität jeder Verdünnungsstufe wurde auf einer Standardkurve mit 4-Parameter-Kurvenanpassung abgelesen.

Probe	Verdünnung	Gemessen [U/mL]	Erwartet [U/mL]	G/E [%]
1	1:100	77.6	77.6	100
	1:200	41.7	38.8	107
	1:400	21.1	19.4	109
	1:800	10.3	9.7	106
	1:1600	4.7	4.9	96
2	1:100	100.7	100.7	100
	1:200	50.7	50.4	101
	1:400	23.7	25.2	94
	1:800	11.1	12.6	88
	1:1600	5.3	6.3	84

15.6 Nachweisgrenze

Die funktionale Sensitivität wurde getestet und bestimmt mit 0.5 U/mL

15.7 Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Präzision:

Der Variationskoeffizient (CV) wurde berechnet für drei Proben mit je 24 Bestimmungen in einem Lauf. Ergebnisse der Präzision der Serie sind in der Tabelle zusammengefasst.

Inter-Assay Präzision:

Der Variationskoeffizient (CV) wurde berechnet für drei Proben aus jeweils 6 Bestimmungen in 5 Läufen. Ergebnisse der Präzision von Lauf-zu-Lauf sind in der Tabelle zusammengefasst.

Intra-Assay IgG		
Probe	Mittelwert [U/mL]	CV [%]
1	11.2	2.5
2	27.6	2.9
3	59.7	4.0

Inter-Assay IgG		
Probe	Mittelwert [U/mL]	CV [%]
1	11.6	6.0
2	31.2	5.2
3	69.5	4.3

15.8 Interferenzen

Es konnten keine Interferenzen mit hämolytischen (bis 1000 mg/dL), lipämischen (bis 3 g/dL Triglyceride) oder Seren mit erhöhten Bilirubinwerten (bis 40 mg/dL) beobachtet werden. Wir empfehlen jedoch aus praktischen Gründen die Verwendung von stark hämolytischen oder lipämischen Proben zu vermeiden.

Des Weiteren wurden keine interferierenden Effekte mit Antikoagulantien (EDTA, Heparin, Citrat) beobachtet.

15.9 Studienergebnisse

Studienpopulation	n	n Pos	[%]
Diabetes mellitus Typ I	100	72	72.0
Normales Humanserum	160	2	1.3

		Klinische Diagnose	
		Pos	Neg
EIA-3608	Pos	72	2
	Neg	28	158
		100	160
		260	

Sensitivität: 72.0 %

Spezifität: 98.8 %

Diagnostische Effizienz: 88.5 %

16 GRENZEN DES VERFAHRENS

Das Ergebnis ist eine diagnostische Hilfe. Eine endgültige klinische Diagnose sollte nicht auf dem Ergebnis eines einzelnen Tests beruhen, sie sollte durch den behandelnden Arzt unter Berücksichtigung aller klinischen und labordiagnostischen Befunde erhoben werden.

Die angegebenen Referenzbereiche für pathologische und normale Antikörperkonzentration in der Patientenprobe sollten als Empfehlung angesehen werden. Jedes Labor sollte seinen eigenen Referenzbereich etablieren nach ISO 15189 oder nach anderen anwendbaren Laborrichtlinien.

1 BREVE DESCRIZIONE

Anti-Insulin ELISA è un test immunometrico per la misurazione quantitativa degli anticorpi di classe IgG contro insulina in campioni di siero umano o plasma.

Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso professionale nella diagnostica in vitro.

2 METODOLOGIA

Micropiastra: rivestiti con antigene umano ricombinante insulina.

La determinazione è basata su una reazione immune indiretta legata a un enzima con le seguenti fasi: gli anticorpi presenti nei campioni positivi legano gli antigeni presenti sulla superficie dei due pozzetti di reazione formando un complesso antigene-anticorpo. Dopo un periodo di incubazione, una prima fase di lavaggio rimuove le molecole non legate e le molecole non specifiche legate.

Successivamente l'enzima coniugato aggiunto lega il complesso antigene-anticorpo fissato. Dopo un periodo d'incubazione, una seconda fase di lavaggio rimuove l'enzima coniugato non legato. L'aggiunta della soluzione di enzima-substrato provoca idrolisi e la comparsa del colore durante l'incubazione. L'aggiunta di un acido interrompe la reazione formando un giallo prodotto finale.

L'intensità del colore giallo è correlata alla concentrazione del complesso antigene-anticorpo e può essere misurata fotometricamente a 450 nm.

3 RIASSUNTO E DESCRIZIONE DEL TEST

Per dettagli più precisi consultare le istruzioni per l'uso in inglese.

4 CONTENUTO DEL KIT

Simboli		Sufficiente per 96 determinazioni
MICROPLATE	1	Micropiastra a pozzetti separabili costituita da 12 strisce da 8 pozzetti. Pronto per l'uso.
CALIBRATOR A	1x 1.5 mL	Calibratore A 0 U/mL, contenente siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR B	1x 1.5 mL	Calibratore B 6,3 U/mL, contenente anticorpi insulina in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR C	1x 1.5 mL	Calibratore C 12,5 U/mL, contenente anticorpi insulina in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR D	1x 1.5 mL	Calibratore D 25 U/mL, contenente anticorpi insulina in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR E	1x 1.5 mL	Calibratore E 50 U/mL, contenente anticorpi insulina in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR F	1x 1.5 mL	Calibratore F 100 U/mL, contenente anticorpi insulina in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%). Pronto per l'uso.
CONTROL 1 +	1x 1.5 mL	Controllo positivo contiene anticorpi insulina, PBS, BSA, detergente; azoturo di sodio 0.09% come conservante. Pronto per l'uso. La concentrazione è specificata nel certificato di analisi.
CONTROL 2 -	1x 1.5 mL	Controllo negativo contiene anticorpi insulina, PBS, BSA, detergente; azoturo di sodio 0.09% come conservante. Pronto per l'uso. La concentrazione è specificata nel certificato di analisi.
DILUENT	20 mL	Tampone del campione ; giallo; PBS, BSA, detergente azoturo di sodio 0.09% come conservante, concentrato 5x.
CONJUGATE	15 mL	Coniugato enzimatico ; rosso chiaro; contiene anticorpi IgG anti-umani marcati con perossidasi, PBS, BSA, detergente; 0,05% Proclin come conservante. Pronto per l'uso.
TMB	15 mL	TMB Substrato . Reagente pronto all'uso.
STOP	15 mL	Soluzione Stoppante (contiene acido). Pronto per l'uso.
WASH	20 mL	Tampone di lavaggio ; contiene elettroliti triacetato, detergente, azoturo di sodio 0,09% come conservante; concentrato 50x.
	1	Istruzioni per l'uso
	1	Certificato di analisi

5 MATERIALE NECESSARIO

- Lettore di micropiastre con possibilità di misurazione end point, a 450 nm; riferimento 620 nm opzionale
- Software per l'elaborazione dei dati
- Dispensatore multicanale o pipetta sequenziale da 100 µL
- Micropipette con puntali monouso 10 µL, 100 µL, 1000 µL
- Agitatore di tipo vortex
- Orologio da laboratorio
- Acqua distillata oppure deionizzata
- Cilindro di misura per 1000 mL, 100 mL
- Bottiglie di plastica per la conservazione della soluzione di lavaggio

Automazione

Questo saggio ELISA può essere utilizzato su processori automatici aperti ELISA. L'applicazione deve essere convalidata sul rispettivo sistema automatizzato. Le informazioni sono fornite su richiesta.

6 RACCOLTA, CONSERVAZIONE, MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

- I campioni di sangue si devono ottenere in conformità alle direttive vigenti.
- Lasciare che il sangue si coaguli e ricavare il siero per centrifugazione.
- L'uso di sieri emolitici, lipemici ed itterici va evitato.
- I campioni di siero e di plasma si possono conservare raffreddati a 2 °C - 8 °C fino a 5 giorni.
Se si prevede una conservazione più lunga, i campioni dovrebbero essere aliquotati e surgelati a -20 °C.
- Evitare lo scongelamento ed il congelamento ripetuti! Questo può portare alla perdita variabile dell'attività autoimmune o degli anticorpi.
- L'uso di sieri termoattivati è sconsigliato.

7 CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Immagazzinamento della confezione di prova a 2 °C - 8 °C al buio.
- Durante l'immagazzinamento e l'utilizzo non esporre i reagenti a calore, sole o eccessiva luce.
- Immagazzinare micropiastre nel sacchetto con clip in dotazione, sigillate e con il dissecante.
- La confezione di prova non aperta può essere conservata per 18 mesi dalla data di produzione.
I reagenti non aperti sono stabili fino alla scadenza della confezione di prova. Vedere l'etichetta del singolo lotto.
- Il tampone di lavaggio diluito e il tampone del campione diluito sono stabili per almeno 30 giorni a una temperatura di 2 °C - 8 °C. Consigliamo di consumare in giornata le soluzioni pronte.

8 AVVERTENZE OPERATIVE

- Non usare kit scaduti.
- Non intercambiare componenti di kit con diversi numeri di lotto e prodotti.
- Tutti i materiali devono essere conservati a temperatura ambiente.
- Preparare tutti i reagenti ed i campioni. Una volta avviato il ciclo analitico, eseguito la prova senza interruzioni.
- Determinazioni doppie possono essere fatte. In questo modo errori di pipettamento può diventare evidente.
- Utilizzare la procedura analitica indicata.
- Usare sempre campioni freschi.
- Pipettare reagenti e campioni sul fondo del pozzetto.
- Per evitare di riporto o contaminazione, cambiare la punta della pipetta tra i campioni ed i controlli kit differenti.
- Lavare accuratamente i pozzetti e rimuovere tutte le goccioline di tampone di lavaggio al fine.
- Rispettare accuratamente i tempi di incubazione.
- Non riutilizzare piastre già usate.

9 INDICAZIONI E MISURE PRECAUZIONALI

- Tutti i reagenti di questa confezione di prova sono destinati esclusivamente all'uso da parte di personale specializzato nella diagnostica in vitro.
- I componenti, che contengono siero umano, sono stati testati con metodi riconosciuti dalla FDA per rilevare la presenza di HBsAg, HCV, HIV1 e HIV2 e sono risultati negativi. Poiché nessun test può garantire l'assenza di HBsAg, HCV, HIV1 e HIV2, consigliamo di trattare tutti i componenti della confezione di prova contenenti siero come materiale potenzialmente infettivo.
- L'albumina di siero bovino (BSA), contenuta nei componenti, è stata testata per rilevare la presenza di ESB ed è risultata negativa.
- Evitare il contatto con il substrato enzimatico TMB (3,3',5,5'-tetrametil benzidina).
- Soluzione Stoppante contiene acido. Questa concentrazione è classificata come non pericolosa. Evitare il contatto con gli occhi.
- Il mezzo di controllo, il tampone e il tampone di lavaggio contengono 0.09% di azoturo di sodio come conservante. Questa concentrazione non è classificata come pericolosa.
- Il coniugato enzimatico contiene 0.05% di ProClin 300 come conservante. Questa concentrazione è classificata come non pericolosa.

Durante la manipolazione di reagenti, mezzi di controllo e campioni dei pazienti si devono osservare le normali norme di sicurezza e la buona prassi di laboratorio:

- Misure di pronto soccorso: in caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e accuratamente con acqua e sapone. Togliere abiti e scarpe contaminati e lavarli prima di usarli nuovamente. Se il liquido del sistema dovesse entrare in contatto con la cute, lavare accuratamente con acqua. Dopo il contatto con gli occhi, sciacquare con acqua corrente per almeno 10 minuti con le palpebre ben aperte. In caso di necessità consultare un medico.
 - Misure in caso di rilascio involontario: osservare le norme di sicurezza della buona prassi di laboratorio. Evitare il contatto con occhi e cute. Non ingerire. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere, fumare o truccarsi nei luoghi in cui vengono manipolati i campioni oppure i componenti del prodotto. Raccogliere eventuali versamenti con materiale inerte ed eseguire uno smaltimento adeguato dei rifiuti.
 - Dispositivi di protezione individuale: indossare guanti protettivi in lattice o nitrile. Indossare occhiali di protezione.
- In caso di uso conforme non sono note reazioni pericolose.
- Condizioni da evitare: poiché il substrato TMB è fotosensibile, immagazzinare al buio.
 - I rifiuti devono essere smaltiti in conformità alle disposizioni ambientali nazionali e locali.

Osservare le direttive per il controllo di qualità nei laboratori medici riguardanti il trasporto di sieri di riferimento e/o pool di sieri.

10 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Tampone di lavaggio (WASH)

Il contenuto di ogni flacone del concentrato del tampone di lavaggio (20 mL) va diluito prima dell'uso fino ad un volume finale di 1000 mL (1 litro), aggiungendo dell'acqua distillata.

Tampone del campione (DILUENT)

Prima dell'uso, diluire il contenuto (20 mL) di ciascun flacone di diluente campioni concentrato 5x con acqua distillata o deionizzata fino a un volume finale di 100 mL.

11 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Prima di utilizzare nel test diluire tutti i campioni dei pazienti **1:100** con il tampone del campione:

Mettete 990 µL di tampone campione diluito in un tubo di polistirolo e aggiungere 10 µL di campione. Mescolare bene.

Nota: I calibratori / controlli sono pronti per l'uso e non necessitano di diluizioni.

12 ESECUZIONE DEL TEST

Prelevare il numero di strip necessario per l'analisi in funzione del numero di campioni, controlli e calibratori.

1. Dispensare nei rispettivi pozzetti **100 µL** dei calibratori, controlli e campioni prediluiti.
2. Incubare per **30 min** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C).
3. Svuotare i pozzetti e lavare **3 volte con 300 µL** di soluzione di lavaggio.
4. Dispensare **100 µL** di coniugato in ciascun pozzetto.
5. Incubare per **15 min** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C).
6. Svuotare i pozzetti e lavare **3 volte con 300 µL** di soluzione di lavaggio.
7. Dispensare **100 µL** di TMB in ciascun pozzetto.
8. Incubare per **15 min** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C).
9. Dispensare **100 µL** di Soluzione Stoppante a ciascun pozzetto.
10. Incubare per **5 min** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C).
11. **Leggere** la Densità Ottica a 450 nm (riferimento 600-690 nm) e calcolare il risultato.
Il colore è stabile per almeno 30 min. Leggere in questo periodo di tempo.

Esempio di un sistema di dispensazione:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... Campioni, A-F Calibratore, C+, C- Controllo

13 CONVALIDA

Il test è valido solo se le densità ottiche a 450 nm dei calibratori / controlli ed i risultati di lettura per i controlli cadono nei limiti indicati sul certificato di analisi allegato a ciascun kit.

Se tutti questi criteri non sono riscontrati, i risultati devono essere considerati non validi e il test deve essere ripetuto.

14 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Per ottenere risultati quantitativi riportare la densità ottica di ciascun calibratore rispetto alla concentrazione del calibratore per costruire una curva di calibrazione. La concentrazione dei campioni da analizzare è determinata tramite la curva di calibrazione così estrapolata.

Software per l'elaborazione dei dati con i 4 parametri curva e lin-log per densità ottica e la concentrazione è il metodo migliore.

15 CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

15.1 Calibrazione

Il sistema di misurazione è calibrato in unità relative arbitrarie, poiché non esiste uno standard internazionale.

15.2 Campo di misura

Il campo di misura è pari a 0 - 100 U/mL

15.3 Valori normali

Nell'ambito di uno studio sul campo di riferimento con campioni di donatori di sangue sani sono stati rilevati i seguenti valori:

valore limite: 10 U/mL

15.4 Interpretazione dei risultati

Negativo: < 10 U/mL

Positivo: ≥ 10 U/mL

15.5 Linearità

Campioni di pazienti con un'elevata concentrazione di anticorpi specifici sono stati sottoposti a diluizione lineare nel tampone per stabilire il campo dinamico dell'analisi nonché l'estremità inferiore e superiore della linearità. L'attività degli anticorpi di ogni stadio di diluizione è stata calcolata dalla curva di calibrazione con un 4 parametri con assi lin-log coordinate.

Campione	Diluizione	Osservato [U/mL]	Previsto [U/mL]	O/P [%]
1	1:100	77.6	77.6	100
	1:200	41.7	38.8	107
	1:400	21.1	19.4	109
	1:800	10.3	9.7	106
	1:1600	4.7	4.9	96
2	1:100	100.7	100.7	100
	1:200	50.7	50.4	101
	1:400	23.7	25.2	94
	1:800	11.1	12.6	88
	1:1600	5.3	6.3	84

15.6 Limite di determinazione

Sensibilità funzionale: 0,5 U/mL

15.7 Riproducibilità**Precisione intra-assay:**

il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato per tre campioni ognuno con 24 definizioni in un ciclo. I risultati della precisione nella serie sono riassunti nella tabella.

Precisione intra-assay:

il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato per tre campioni rispettivamente da 6 definizioni in 5 cicli. I risultati della precisione da ciclo a ciclo sono riassunti nella tabella.

Intra-test		
Campione	Mezzo [U/mL]	CV [%]
1	11.2	2.5
2	27.6	2.9
3	59.7	4.0

Inter-test		
Campione	Mezzo [U/mL]	CV [%]
1	11.6	6.0
2	31.2	5.2
3	69.5	4.3

15.8 Interferisce

Non si ha osservato nessuna interferencia con emolitico (fino a 1000 mg/dL), lipoideo (fino a 3 g/dL di trigliceridi) o bilirubina (fino a 40 mg/dL) contenenti siero.

Nessuna osservato effetto di interferencia con anticoagulanti (EDTA, eparina, citrato).

15.9 Risultati dello studio

Popolazione di studio	n	n Pos	[%]
Diabetes mellitus Typ I	100	72	72.0
Normal human sera	160	2	1.3

		Diagnosi clinica	
		Pos	Neg
EIA-3608	Pos	72	2
	Neg	28	158
		100	160
		260	

Sensitività: 72.0 %

Specificità: 98.8 %

Efficienza diagnostica: 88.5 %

16 LIMITI DEL PROCEDIMENTO

Questo test è un ausilio diagnostico. La diagnosi clinica definitiva non dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo test, ma dovrebbe essere fatta dal medico, dopo tutto i risultati clinici e di laboratorio sono state valutate concernente l'intero quadro clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione per la terapia dovrebbe essere presa individualmente.

Gli intervalli di riferimento sopra patologiche e normale per gli anticorpi nei campioni dei pazienti devono essere considerati come raccomandazioni solo. Ogni laboratorio deve stabilire i propri range secondo la ISO 15189 o ad altre linee guida del laboratorio applicabili.

1 DESCRIPCIÓN BREVE

Anti-Insulin ELISA es una inmunoensayo enzimático para la cuantificación de anticuerpos tipo IgG frente a insulina en muestras de suero humano o plasma.

Este producto se ha concebido exclusivamente para su uso profesional en el diagnóstico in vitro.

2 METODOLOGÍA

Los pocillos de la microplaca están recubiertos con antígeno recombinante humana insulina.

La determinación se basa en una reacción inmunológica indirecta ligada a enzimas con los pasos siguientes: los anticuerpos presentes en muestras positivas se ligan al antígeno revestido en la superficie de los dos pocillos de reacción formando un complejo antígeno-anticuerpo. Tras la incubación, un primer paso de lavado elimina las moléculas no ligadas y las moléculas ligadas no específicas. El conjugado de enzima añadido a continuación se liga al complejo anticuerpo-antígeno inmovilizado. Tras la incubación, un segundo paso de lavado elimina el conjugado de enzimas no ligado. La adición de la solución de sustrato de enzimas tiene como resultado la hidrólisis y el desarrollo del color durante la incubación. La adición de un ácido detiene la reacción de formación de un color amarillo del producto final.

La intensidad del color amarillo guarda relación con la concentración del complejo anticuerpo-antígeno y puede medirse fotométricamente a 450 nm.

3 RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Consultar el manual de usuario en inglés.

4 CONTENIDO DEL KIT

Simbolos		Válido para 96 determinaciones
MICROPLATE	1	Microplaca fraccionable compuesta por 12 tiras de 8 pocillos cada una. Listo para el uso
CALIBRATOR A	1x 1.5 mL	Calibrador A 0 U/mL, contiene una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%), amarillo. Listo para el uso.
CALIBRATOR B	1x 1.5 mL	Calibrador B 6,3 U/mL, contiene insulina anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%), amarillo. Listo para el uso.
CALIBRATOR C	1x 1.5 mL	Calibrador C 12,5 U/mL, contiene insulina anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%), amarillo. Listo para el uso.
CALIBRATOR D	1x 1.5 mL	Calibrador D 25 U/mL, contiene insulina anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%), amarillo. Listo para el uso.
CALIBRATOR E	1x 1.5 mL	Calibrador E 50 U/mL, contiene insulina anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%), amarillo. Listo para el uso.
CALIBRATOR F	1x 1.5 mL	Calibrador F 100 U/mL, contiene insulina anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%), amarillo. Listo para el uso.
CONTROL 1 +	1x 1.5 mL	Control positiva , contiene insulina anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%), amarillo. Listo para el uso. Concentraciones especificadas en certificado de análisis.
CONTROL 2 -	1x 1.5 mL	Control negativa , contiene insulina anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%), amarillo. Listo para el uso. Concentraciones especificadas en certificado de análisis
DILUENT	20 mL	Tampón de muestra , contiene PBS, BSA, detergente, conservante ácido de sodio 0.09%, amarillo, 5x concentrado.
CONJUGATE	15 mL	Conjugado , contiene anticuerpos contra la IgG humanas, marcados con HRP; PBS, BSA, detergente, conservante Proclin 0.05%, rojo claro. Listo para el uso.
TMB	15 mL	TMB solución de sustrato , contiene 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, incoloro. Listo para el uso.
STOP	15 mL	Solución de paro , contiene ácido. Listo para el uso.
WASH	20 mL	Solución de lavado , contiene Tris, detergente, conservante ácido de sodio 0.09%; 50x concentrado.
	1	Instrucciones de uso
	1	Certificado de Análisis

5 EQUIPOS REQUERIDOS DE LABORATORIO

- Lector de microplacas capaz de leer a punto final a 450 nm; opcional: referencia 620 nm
- Software para cálculo de resultados
- Pipeta multicanal, o de repetición para 100 µL
- Mezclador Vortex
- Micropipetas con jeringas de un solo uso para 10 µL, 100 µL, 1000 µL
- Reloj de laboratorio
- Agua destilada o desionizada
- Probeta graduada para 1000 mL, 100 mL
- Contenedor de plástico para la solución de lavado diluida

Automatización:

Este ensayo ELISA puede ser utilizado en procesadores automáticos abiertos ELISA. La aplicación tiene que ser validado en el sistema automatizado correspondiente. La información se proporciona bajo petición.

6 RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACION

- Las muestras de sangre se deben obtener en base a las directivas y regulaciones de vigencia actual.
- Dejar coagular la sangre y obtener el suero mediante centrifugación.
- Se debe prevenir la utilización de sueros hemolíticos, lipémicos e ictericos.
- Las muestras de suero y plasma pueden conservarse durante un período máximo de 5 días con refrigeración y temperaturas entre 2 °C a 8 °C. En caso de requerir una conservación más larga, se deben alícuotar las muestras y congelarse con una temperatura de -20 °C.
- Se ha de prevenir la repetida congelación y descongelación! Esto puede provocar una pérdida variable de actividad de los autoanticuerpos o anticuerpos.
- No se recomienda la utilización de sueros desactivados frente al calor.

7 CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

- Almacene el kit a 2 °C - 8 °C en un lugar oscuro.
- No exponga los reactivos al calor, al sol o a una luz intensa durante su almacenamiento o uso.
- Almacene la microplaca sellada en la bolsa con pinza suministrada con un secante.
- El tiempo de conservación de los kits sin abrir es de 18 meses desde la fecha de fabricación. Los reactivos sin abrir se mantienen estables hasta la fecha de caducidad del kit. Consulte las etiquetas de cada lote individual.
- Los tampones de lavado diluidos y tampón de muestra se mantienen estables durante al menos 30 días si se almacenan a 2 °C - 8 °C. Recomendamos que se use en el mismo día.

8 NOTAS TECNICAS

- No usar los componentes del kit después de la fecha de caducidad.
- No intercambiar componentes de diferentes lotes y productos.
- Todos los componentes deben ser acondicionados a temperatura ambiente antes de su uso (20 °C - 28 °C).
- Preparar todos los reactivos y muestras antes de empezar el ensayo. Una vez iniciado el test debe realizarse sin interrupción.
- Determinaciones dobles puede realizarse. Por este medio los errores de pipeteo puede llegar a ser evidentes.
- Procesar todos los pasos del test en el orden indicado.
- Utilizar siempre las diluciones de muestra recién preparadas.
- Pipetear los reactivos y muestras en el fondo del pocillo.
- Para eliminar arrastre, cambiar las puntas de pipeta entre las muestras y los controles.
- Es importante lavar exhaustivamente los pocillos y eliminar las últimas gotas de tampón de lavado.
- Los tiempos de incubación deben controlarse cuidadosamente.
- Nunca deben reutilizarse los pocillos.

9 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Todos los reactivos de este kit son para su uso profesional para el diagnóstico in vitro.
- Se han analizado todos los componentes que contienen suero humano y el resultado ha sido negativo para los métodos autorizados de HBsAg, VHC, VIH1 o VIH2. Sin embargo, las pruebas no pueden garantizar la ausencia de HBsAg, VHC, VIH1 o VIH2, por lo que todos los reactivos basados en suero humano en este juego se deben manejar como si fuesen contagiosos.
- Se le ha realizado la prueba de EEB a la albúmina de suero bovino (ASB) usada en los componentes y el resultado ha sido negativo.
- Evite el contacto con el sustrato TMB (3,3',5,5' - tetrametilbencidina).
- Solución de paro contiene ácido, cuya clasificación es de no peligrosa. Evite el contacto con la piel.
- Los tampones de control, de muestra y de lavado contienen 0.09% de ácido de sodio como conservante. Esta concentración está clasificada como no peligrosa.
- Las enzimas conjugadas contienen 0.05% Proclin como conservante. Esta concentración está clasificada como no peligrosa.

Durante el tratamiento de todos los reactivos, de los controles y de las muestras de suero cumpla con la regulación vigente en materia de seguridad en el laboratorio y con las buenas prácticas de laboratorio:

- Medidas de primeros auxilios: en caso de contacto con la piel, lave cuidadosamente la zona con agua y jabón.
- Qítense la ropa y el calzado contaminado y lávelos antes de volverlos a utilizar. Si la piel entra en contacto con los fluidos del sistema, lave la zona cuidadosamente con agua. En caso de contacto con los ojos, aclare con cuidado el ojo abierto con agua corriente durante al menos 10 minutos. En el caso de que sea necesario, consulte a un médico.
- Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de urgencia:
- Siga las regulaciones en materia de seguridad en el laboratorio. Evite el contacto con la piel y los ojos. No ingiera el producto. No pipetee nunca con la boca. No coma, beba, fume ni se aplique maquillaje en las zonas en las que se trabaja con las muestras o con los reactivos del juego. En el caso de derrame, absorba el producto con un material inerte y elimine el producto derramado como corresponda.
- Controles de exposición/ protección personal: utilice guantes de protección de caucho de nitrilo o de látex natural. Use gafas de protección. No se conocen reacciones peligrosas si se usa conforme a su fin.
- Condiciones que se deben evitar: la solución de sustrato es sensible a la luz, se deben almacenar en un lugar oscuro.
- Siga la normativa nacional o regional para eliminar los desechos del laboratorio.

Siga las directrices en materia de realización de controles de calidad en laboratorios médicos mediante controles de ensayo.

10 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución de lavado (WASH)

El contenido de cada botella del concentrado de solución de lavado (50x) debe diluirse mediante adición de agua destilada para obtener un volumen final de 1000 mL (1 litro).

Tampón de muestra (DILUENT)

Antes de su uso, diluir el contenido (20 mL) del vial de tampón de muestras concentrado 5x con agua destilada o desionizada hasta un volumen final de 100 mL.

11 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Antes de su uso en ensayo diluir las muestras de pacientes **1:100** con tampón de muestra:

Ponga 990 µL de tampón de muestra prediluido en un tubo de poliestireno y se añaden 10 µL de muestra. Agitar bien.

Los calibradores / controles se presentan listos para su uso y no deben ser diluidos.

12 PROCEDIMIENTO

Preparar el número de tiras de la microplaca suficiente para disponer los calibradores, controles y muestras prediluidas.

1. Pipetear **100 µL** de calibradores, controles y muestras prediluidas en los pocillos.
2. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C)
3. Vaciar los pocillos y lavar **3 veces con 300 µL** de solución de lavado.
4. Dispensar **100 µL** de conjugado en cada pocillo
5. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C)
6. Vaciar los pocillos y lavar **3 veces con 300 µL** de solución de lavado.
7. Dispensar **100 µL** de sustrato TMB en cada pocillo
8. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C)
9. Añadir **100 µL** de solución de paro a todos los pocillos
10. Incubar durante **5 minutos** a temperatura ambiente
11. **Leer la densidad óptica** a 450 nm (referencia 600-690 nm) y calcular los resultados.
El color desarrollado en la reacción es estable durante 30 minutos. Leer durante este periodo.

Ejemplo de un esquema de pipeteo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... Muestras A-F Calibrador C+, C- Control

13 VALIDACIÓN

El test se considera válido siempre que la densidad óptica a 450 nm del calibradores y controles y los resultados de los controles se ajuste al rango respectivo indicado en el certificado de análisis incluido en cada kit.

Si no se cumple alguno de los criterios los resultados no se consideran válidos y el ensayo debe repetirse.

14 INTERPRETACION DE RESULTADOS

Para obtener resultados cuantitativos parcela la densidad óptica de cada calibrador frente a la concentración del calibrador para crear una curva de calibración. La concentración de las muestras de pacientes se obtendrá por interpolación en la gráfica así obtenida.

Uso de software de reducción de datos de un 4-parámetros-Fit con coordenadas lin-log de la densidad óptica y la concentración es el método de reducción de datos de la elección.

15 LOS CARACTERISTICAS DE FUNCIONAMIENTO

15.1 Calibrado

Este sistema de ensayo se calibra en unidades arbitrarias relativas, ya que no existe una preparación de referencia internacional.

15.2 Rango de medición

El intervalo de cálculo de este ensayo ELISA es 0 - 100 U/mL

15.3 Valores previstos

En un estudio habitual del intervalo con muestras de suero de donantes de sangre sanos se han establecido los siguientes intervalos con el ensayo ELISA:

valor límite 10 U/mL

15.4 Interpretación de los resultados

Negativa < 10 U/mL

positiva ≥ 10 U/mL

15.5 Linealidad

Se diluyeron en serie muestras de pacientes con niveles altos de anticuerpos en un tampón de muestra para demostrar el intervalo dinámico del ensayo en el límite superior/ inferior de linealidad. Se calculó la actividad para cada dilución a partir de la curva de calibración con un 4-parámetros-Fit con el lin-log coordina.

Muestra.	Dilución	Observado [U/mL]	Esperado [U/mL]	O/E [%]
1	1:100	77.6	77.6	100
	1:200	41.7	38.8	107
	1:400	21.1	19.4	109
	1:800	10.3	9.7	106
	1:1600	4.7	4.9	96
2	1:100	100.7	100.7	100
	1:200	50.7	50.4	101
	1:400	23.7	25.2	94
	1:800	11.1	12.6	88
	1:1600	5.3	6.3	84

15.6 Límite de detección

Sensibilidad funcional: 0,5 U/mL

15.7 Reproducibilidad

Precisión intranalítica:

se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada una de las tres (3) muestras a partir de los resultados de 24 análisis en una única serie. En la tabla siguiente se muestran los resultados para la precisión intranalítica.

Precisión entre ensayos:

se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada una de las tres muestras a partir de los resultados de seis (6) análisis en cinco (5) series diferentes. Los resultados para las precisiones de serie en serie se muestran en la siguiente tabla.

Intra-Ensayo		
Muestra	Medio [U/mL]	CV [%]
1	11.2	2.5
2	27.6	2.9
3	59.7	4.0

Inter-Ensayo		
Muestra	Medio [U/mL]	CV [%]
1	11.6	6.0
2	31.2	5.2
3	69.5	4.3

15.8 Interfering substances

No se ha observado ninguna interferencia con sueros hemolíticos (hasta 1000 mg/dL), lipémicos (hasta 3 g/dL triglicéridos) o ictericos (hasta 40 mg/dL). Ni se han observado efectos de interferencia con anticoagulantes (EDTA, heparina, citrato).

15.9 Resultados del estudio

Study population	n	n Pos	[%]
Diabetes mellitus Typ I	100	72	72.0
Normal human sera	160	2	1.3

		Diagnóstico clínico	
		Pos	Neg
EIA-3608	Pos	72	2
	Neg	28	158
		100	160
		260	

Sensibilidad: 72.0 %

Especificidad: 98.8 %

Eficiencia diagnóstica: 88.5 %

16 LÍMITE DEL PROCEDIMIENTO

Este ensayo es una ayuda diagnóstica. El diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una prueba, sino que debe ser realizada por el médico después de todo, los hallazgos clínicos y de laboratorio han sido evaluados respecto a la imagen completa clínica del paciente. También todas las decisiones de tratamiento deben tenerse en cuenta individualmente.

Los rangos de referencia anteriores, deberían considerarse únicamente como guía. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales y patológicos de anticuerpos en muestras de pacientes.

17 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI / BIBLIOGRAFÍA

1. Reeves, W. G. Insulin Antibody Determination: Theoretical and Practical Considerations. *Diabetologia* 24, 399 (1983).
2. Atkinson, M. A., Fisk, D. D., Spillar, R. P. and MacLaren, N. K. Insulin antibodies as markers for Insulin dependent diabetes mellitus (IDD). *Diabetes* 34, 926 - 930 (1985).
3. Willein, T., Nicholson, S. and Casey, C. A Micro Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Insulin Antibodies in Serum. *J. Imm. Methods* 76, 185 (1985).
4. Kobayashi, N. et al. A Solid-Phase Enzyme Immunoassay for Anti-Insulin Antibody in Diabetes Mellitus Patients. *J. Imm. Methods* 84, 245 (1985).
5. Wisslein, T. et al. Value of Insulin Antibodies as Serum marker for Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet* 1, 480 (1985).
6. Soeldner, J. S. et al. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and Autoimmunity: Islet-Cell Autoantibodies and beta-Cell Failure. *New Engl. J. Med.* 313, 893 (1985).
7. Torfs, C. P. et al. Long Term Frozen Sera for Epidemiological Studies of Antibodies. *Lancet* 1, 503 (1986).
8. Seino, S. et al. Characterisation of Circulating Insulin in Insulin Autoimmune Syndrome. *Clin. Endo. & Metab.* 62, 64 (1986).
9. Boitard, C. H. and McDewitt, H. O. Immunology of insulin-dependent diabetes mellitus. In: Cohen, J. R., (ed.) *Perspectives on autoimmunity*, 39-58 (1987). CRC Press, Boca Raton, FL. Nouvo, J. A., Baker, Jr., J. R., Wartowsky, I. et al. Autoantibodies to insulin are present in sera of patients with autoimmune thyroid diseases. *Diabetes*, 37, 317-320 (1988).
10. Witkin, T. J. Insulin Autoantibodies as markers for type I diabetes. *Endocrine Reviews*, 11, 92-104 (1990).

SYMBOLS USED WITH DRG ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
CE	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
IVD	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
REF	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
LOT	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità

Anti-Glicoproteina Oligodendrocitaria Mielinica (MOG) IFA

Istruzioni per il test in immunofluorescenza indiretta

CODICE NO.	ANTICORPI ANTI	SUBSTRATO	SPECIE	FORMATO VETRINI x POZZETTI
FA 1156-1003-50 FA 1156-1005-50 FA 1156-1010-50	glicoproteina oligodendrocitaria mielinica (MOG)	cellule transfettate controllo della trasfezione	EU 90	10 x 03 (030) 10 x 05 (050) 10 x 10 (100)

Indicazione: Il test permette la determinazione in vitro di tipo qualitativo o semiquantitativo degli anticorpi umani di classe immunoglobulinica IgG diretti contro la glicoproteina oligodendrocitaria mielinica (MOG) nei campioni dei pazienti a supporto della diagnosi delle malattie demielinizzanti del sistema nervoso centrale.

Applicazione: Gli autoanticorpi diretti contro MOG sono determinabili nelle malattie demielinizzanti del sistema nervoso centrale, soprattutto nei pazienti pediatrici. Il test in IFA EUROIMMUN permette la determinazione sia sensibile che specifica degli anticorpi.

Principio del test: Le cellule esprimenti MOG vengono incubate con il campione diluito del paziente. Se la reazione è positiva, specifici anticorpi di classe IgA, IgG e IgM si legano agli antigeni. In un secondo passaggio, gli anticorpi legatisi reagiscono con anticorpi anti-immunoglobuline umane coniugati con FITC e vengono evidenziati tramite microscopio a fluorescenza.

Contenuto di una confezione da 50 determinazioni (ad es., FA 1156-1005-50):

Descrizione	Formato	Simbolo
1. Vetrini ciascuno contenente 5 x 2 BIOCHIP coattate con cellule transfettate con MOG e cellule transfettate di controllo	10	
2. Anticorpi anti-IgG umane (capra) coniugati con FITC, soluzione pronta per l'uso	1 x 1,5 ml	
3. Controllo positivo: autoanticorpi diretti contro MOG, soluzione pronta per l'uso	1 x 0,1 ml	
4. Controllo negativo: autoanticorpi umani negativi, soluzione pronta per l'uso	1 x 0,1 ml	
5. Tampone di diluizione, pronto per l'uso	2 x 4,5 ml	
6. Sale per PBS pH 7,2	2 confezioni	
7. Tween 20	2 x 2,0 ml	
8. Mezzo di montaggio, pronto per l'uso	1 x 3,0 ml	
9. Vetrini copri oggetto (62 mm x 23 mm)	12 pezzi	
10. Scheda tecnica (istruzioni per l'uso)	1 libretto	---
Descrizione del lotto		Temperatura di conservazione
Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Utilizzabile integro fino al

I singoli vetrini (ad es., EUROIMMUN codice no. FB 1156-1005-50) vengono forniti assieme ai vetrini copri oggetto. Ulteriori controlli positivi (ad es., EUROIMMUN codice no. CA 1156-0101) e controlli negativi (ad es., EUROIMMUN codice no. CA 1000-0101) possono eventualmente essere ordinati.

L'esecuzione del test necessita di supporti vetrosi per reagenti non compresi nel kit. Questi possono essere richiesti a EUROIMMUN con codice no.:

- ZZ 9999-0110 Supporti vetrosi per vetrini contenenti fino a 10 pozzetti (5 x 5 mm).

Conservazione e stabilità: I vetrini e i reagenti devono essere conservati ad una temperatura tra +2°C e +8°C. Se non aperti, tutti i componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata.

Smaltimento rifiuti: I campioni di siero o plasma, i controlli ed i vetrini devono essere trattati come materiale potenzialmente infetto. Tutti i reagenti devono essere smaltiti in conformità alle disposizioni di legge.

Le modifiche alla versione precedente sono evidenziate in grigio.



Esecuzione del test (pozzetti 5 x 5 mm)

La tecnica **TITERPLANE** è stata sviluppata da EUROIMMUN al fine di standardizzare le analisi immunologiche: i campioni da testare, i controlli ed il coniugato vengono depositati nei pozzetti di un supporto vetroso per reagenti. I vetrini con i BIOCHIP vengono posizionati negli appositi spazi del supporto vetroso; in questo modo tutti i BIOCHIP sono in contatto con i reagenti e le singole reazioni possono iniziare simultaneamente. Posizione ed altezza delle gocce sono esattamente definite dalla geometria del sistema. Dato che i liquidi sono confinati in uno spazio chiuso, non è necessario l'impiego di una camera umida convenzionale. E' possibile incubare un numero illimitato di campioni uno accanto all'altro simultaneamente e nelle stesse condizioni.

Preparazione: La preparazione dei reagenti e del campione di siero o di plasma è descritta a **pagina 4** di questa scheda tecnica.

Deposizione: Depositare **30 µl del siero diluito** su ogni pozzetto del supporto vetroso; evitare la formazione di bolle d'aria. Trasferire tutti i campioni da testare prima di iniziare l'incubazione (fino ad un massimo di 200 pozzetti). Utilizzare la base in polistirolo come riferimento.

Incubazione: Iniziare le reazioni posando i vetrini negli appositi spazi del supporto vetroso. Accertarsi che ogni campione sia in contatto con il suo BIOCHIP e che non vi sia cross-contaminazione tra i vari pozzetti.
Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C).

Lavaggio: Sciacquare i vetrini direttamente con un beaker contenente il tampone e quindi immergerli per almeno **5 minuti** nell'apposita cuvette contenente PBS-Tween. Se disponibile agitare con un agitatore rotante. Lavare al massimo 16 vetrini, poi sostituire il PBS-Tween con nuovo buffer pulito.

Deposizione: Aggiungere **25 µl di coniugato** ad ogni pozzetto di un supporto vetroso pulito. Riempire tutti i pozzetti prima di continuare l'incubazione. E' consigliabile utilizzare una pipetta multi-stepper. Miscelare accuratamente il coniugato prima dell'uso. Per risparmiare tempo, il coniugato può essere depositato nei pozzetti durante la prima incubazione in supporti vetrosi separati.

Incubazione: Estrarre un vetrino alla volta dal tampone PBS-Tween. Entro 5 secondi asciugare con un pezzo di carta assorbente solo la parte posteriore ed i due bordi lunghi del vetrino e posizionare immediatamente il vetrino con i BIOCHIP negli appositi spazi del supporto vetroso. Non asciugare la superficie tra i BIOCHIP. Controllare l'avvenuto contatto tra i BIOCHIP ed il coniugato. Procedere allo stesso modo per gli altri vetrini. Da questo punto in poi evitare l'esposizione dei vetrini alla luce diretta.
Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C).

Lavaggio: Riempire la cuvette con PBS-Tween nuovo. Sciacquare i vetrini direttamente con un beaker contenente il tampone ed immergerli per almeno **5 minuti** nell'apposita cuvette contenente PBS-Tween. Se disponibile agitare con un agitatore rotante. Lavare al massimo 16 vetrini, poi sostituire il PBS-Tween con nuovo buffer pulito.

Montaggio: Porre il mezzo di montaggio sul vetrino copri oggetto – depositare una goccia di **max. 10 µl di mezzo di montaggio** in corrispondenza di ciascun pozzetto. Utilizzare il supporto di polistirolo per il montaggio. Estrarre un vetrino alla volta, asciugare il retro e i 4 bordi con carta assorbente. Adagiare delicatamente il vetrino con i BIOCHIP rivolti verso il vetrino copri oggetto. Controllare che quest'ultimo si incastri perfettamente con il vetrino. Correggere la posizione se necessario. Procedere con gli altri vetrini.

Valutazione: Leggere la fluorescenza con apposito microscopio.
Raccomandazioni generali: obiettivo 20x (sezioni d'organo, cellule infettate), 40x (substrati cellulari).
Filtro di eccitazione: 450-490 nm, separatore colorimetrico: 510 nm, filtro di bloccaggio: 515 nm.
Sorgente luminosa: lampada a vapori di mercurio, 100 W, EUROIMMUN LED, EUROStar Bluelight.

**Tecnica TITERPLANE**

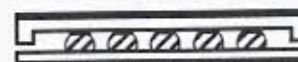
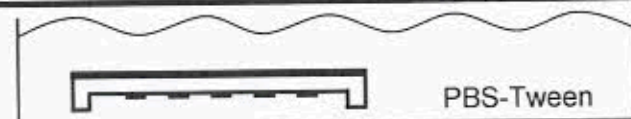
vetrino BIOCHIP



BIOCHIP

supporto vetroso per
reagenti**Deposizione:** 30 µl per pozzetto

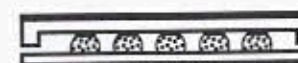
campione diluito

**Incubare:** 30 min**Lavare:** 1 s risciacquo
5 min in cuvette

PBS-Tween

Deposizione: 25 µl per pozzetto

conjugato

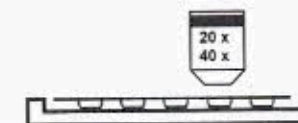
**Incubare:** 30 min**Lavare:** 1 s risciacquo
5 min in cuvette

PBS-Tween

Montaggio: max. 10 µl per pozzetto

mezzo di montaggio

vetrino coprioggetto


Valutazione: microscopio a fluorescenza

Incubazione automatizzata: Il kit può essere incubato utilizzando strumenti automatizzati, ad es., IF Sprinter, Sprinter XL, EUROLabLiquidHandler o altri. L'incubazione e le condizioni di lavaggio programmate dovrebbero essere le stesse di quelle descritte nella procedura manuale. Le configurazioni del test per gli strumenti EUROIMMUN sono validate in combinazione con il kit. Qualunque altra combinazione deve essere validata dall'utilizzatore. Per i dettagli far riferimento al manuale dello strumento.



Preparazione e stabilità dei reagenti

Nota: Dopo l'apertura iniziale, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati ad una temperatura tra +2°C e +8°C e protetti da contaminanti, salvo indicazioni riportate qui di seguito.

- **Vetrini:** Pronti per l'uso. Aprire ciascuna bustina contenente il vetrino con i BIOCHIP solo quando queste abbiano raggiunto la temperatura ambiente (tra +18°C e +25°C; la condensa può danneggiare il substrato). Non toccare i BIOCHIP. Se la bustina è danneggiata, il vetrino non deve essere utilizzato per il test diagnostico.
- **Anticorpo secondario coniugato con FITC:** Pronto per l'uso. La soluzione deve essere miscelata accuratamente prima del suo primo utilizzo .
- **Sieri di controllo positivo e negativo:** Pronti per l'uso. Prima di utilizzare i sieri di controllo per la prima volta, miscelare la soluzione accuratamente.
- **PBS-Tween:** 1 confezione di "Sale per tampone fosfato" deve essere disciolta in 1 litro di acqua distillata (meglio se acqua per infusione, aqua ad injectabilia) e miscelata con 2 ml di Tween 20 (agitare per 20 minuti finché la soluzione non è omogenea). Il tampone PBS-Tween così preparato può essere conservato tra +2°C e +8°C generalmente per 1 settimana. Il tampone PBS-Tween non deve essere usato se la soluzione presenta torbidità o segni di contaminazione.
- **Mezzo di montaggio:** Pronto per l'uso.
- **Supporti vetrosi per reagenti:** I pozzetti di reazione dei supporti vetrosi devono essere idrofili mentre l'area circostante idrofobica. Se necessario, lasciare in ammollo in Deconex 11 universale (2%) (EUROIMMUN codice no.: ZZ 9912-0101) per 12 ore. Successivamente sciacquare abbondantemente con acqua e asciugare. Per pulire: Frizionare i supporti vetrosi con Extran MA 01 5% (EUROIMMUN codice no.: ZZ 9911-0130) e sciacquare abbondantemente con acqua. Per disinfettare: Spruzzare abbondantemente i supporti vetrosi con Mikrozid AF (EUROIMMUN codice no.: ZZ 9921-0125), capovolgere i supporti e lasciare agire per 5 minuti. Successivamente, sciacquare abbondantemente con acqua e asciugare.

Avvertenze: I BIOCHIP coattati con i substrati antigenici sono stati trattati con un agente fissativo disinfettante. Mediante specifici test ELISA o test in Immunofluorescenza Indiretta si è dimostrata l'assenza di HBsAg e degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2, e anti-HCV nei sieri di controllo. **Tuttavia, tutti i componenti del kit devono essere trattati come materiale potenzialmente infetto.** Alcuni reagenti contengono anche l'agente sodio azide in concentrazione non dichiarata. Evitare il contatto con la pelle.

Preparazione e stabilità dei campioni dei pazienti

Campioni: Siero umano o EDTA, eparina o plasma citrato.

Stabilità: I campioni di siero o plasma da testare possono essere conservati tra +2°C e +8°C fino a 14 giorni. I campioni diluiti devono essere testati entro la giornata.

Diluizione del campione raccomandata per la valutazione qualitativa: I campioni da testare vengono diluiti 1:10 con tampone di diluizione. Per esempio, diluire 11,1 µl di campione in 100 µl di tampone di diluizione e miscelare accuratamente, ad es., mediante vortex per 4 secondi.

Diluizione del campione raccomandata per la valutazione semiquantitativa: La diluizione dei campioni da testare viene eseguita utilizzando il tampone di diluizione. Aggiungere 100 µl di tampone di diluizione a ciascuna provetta e miscelare con 11,1 µl della soluzione a concentrazione più alta, e miscelare mediante vortex per 2 secondi. EUROIMMUN raccomanda di incubare i campioni diluiti almeno 1:10.



Diluizione	Schema di diluizione		
1:10	100 µl tampone di diluizione + 11,1 µl campione non diluito		Dopo ogni due diluizioni, è necessario utilizzare un nuovo puntale per evitare contaminazioni.
1:100	100 µl tampone di diluizione + 11,1 µl campione diluito 1:10		
1:1000	100 µl tampone di diluizione + 11,1 µl campione diluito 1:100		
⋮	⋮		

Interpretazione dei risultati

Pattern di fluorescenza (reazione positiva): Gli anticorpi diretti contro la **glicoproteina oligodendrocitaria mielinica** reagiscono con le cellule transfettate del substrato. Producono una fluorescenza della cellula piatta, da liscia a grossolana a granulare, con un accento della membrana cellulare. L'area del nucleo cellulare è solo leggermente macchiata.

A titoli elevati, gli anticorpi MOG-specifici danno luogo ad un pattern granulare nella lamina alba del cervelletto.

Se tutte le cellule sono colorate, ad es., anche le cellule transfettate di controllo, significa che sono presenti gli anticorpi diretti contro altri antigeni cellulari.

Se il controllo positivo non presenta una fluorescenza specifica oppure il controllo negativo dimostra una fluorescenza specifica, i risultati che si ottengono non devono essere presi in considerazione ed il test deve essere ripetuto.

Sul sito web di EUROIMMUN è possibile osservare un grande numero di pattern di fluorescenza (www.euroimmun.com).

Valutazione qualitativa raccomandata:

Reattività delle cellule transfettate (IgG)	Risultato
Nessuna reazione a 1:10	Negativo. Nessun anticorpo diretto contro MOG è stato ritrovato nel campione di siero/plasma del paziente.
Reazione positiva a 1:10	Positivo. Indicazione di neuromielite ottica o di disturbo dello spettro associato alla neuromielite ottica.

Valutazione semiquantitativa raccomandata: Il titolo anticorpale è definito come il fattore di diluizione più basso con il quale è possibile evidenziare fluorescenza specifica. Questo deve essere confrontato con la reazione che si ottiene utilizzando un siero negativo diluito con lo stesso fattore di diluizione.

I titoli anticorpali possono essere determinati in accordo alla tabella riportata qui di seguito:

Fluorescenza a				Titolo anticorpale
1:10	1:100	1:1000	1:10000	
debole	negativa	negativa	negativa	1:10
moderata	negativa	negativa	negativa	1:32
intensa	debole	negativa	negativa	1:100
intensa	moderata	negativa	negativa	1:320
intensa	intensa	debole	negativa	1:1000
intensa	intensa	moderata	negativa	1:3200
intensa	intensa	intensa	debole	1:10000
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮



Limiti della procedura

1. La diagnosi non si dovrebbe basare su un singolo risultato del test. I sintomi clinici del paziente dovrebbero sempre essere presi in considerazione assieme ai risultati sierologici da parte del medico.
2. L'adeguamento di questo metodo per l'utilizzo con processori automatizzati di campioni e di strumentazioni che dispensano altri liquidi, totalmente o parzialmente, può dar luogo a differenze nei risultati rispetto a quelli ottenuti utilizzando la procedura manuale. Sta alla responsabilità di ciascun laboratorio validare i risultati ottenuti con la procedura automatizzata entro limiti accettabili.
3. Lo scorretto trattamento dei vetrini durante la fase di colorazione, specialmente lasciare asciugare i vetrini tra un passaggio e l'altro, può risultare in un pattern di apparenza "sbiadito, lavato via" e/o in una colorazione di fondo importante.
4. Le cuvette portavetrini utilizzate per il lavaggio dei vetrini dovrebbero essere pulite da eventuali residui. L'utilizzo di cuvette portavetrini contenenti residui può causare artefatti nella colorazione.
5. La sorgente luminosa, i filtri e il dispositivo ottico del microscopio a fluorescenza possono influenzare la sensibilità del metodo. Con l'utilizzo delle tradizionali lampade a mercurio, la prestazione del microscopio viene significativamente influenzata dalla corretta manutenzione, specialmente dal corretto allineamento della lampada e dalla sostituzione della lampada dopo il periodo di tempo raccomandato. I microscopi a fluorescenza di EUROIMMUN che hanno come sorgente di luce LED BlueLight offrono molti vantaggi. Contattare EUROIMMUN per ulteriori dettagli.

Caratteristiche del test

Antigeni: Per la determinazione degli anticorpi diretti contro la **glicoproteina oligodendrocitaria mielinica (MOG)**, si utilizzano come substrato standard cellule EU 90 specificamente transfettate.

Range di misurazione: Il fattore di diluizione di partenza è 1:10. I campioni possono successivamente essere diluiti con un fattore di diluizione 10 in modo che la serie di diluizioni è 1:100, 1:1000, 1:10000, etc. Non esiste alcun limite superiore per le diluizioni.

Riproducibilità:

Riproducibilità	Inter-lotto	Intra-saggio	Inter-saggio
Requisito minimo	3 lotti x 3 campioni x 1 seduta x singola determinazione: max. ± 1 livello del titolo	1 lotto x 3 campioni x 1 seduta x 10 determinazioni: max. ± 1 livello del titolo	1 lotto x 3 campioni x 2 sedute x determinazioni in doppio: max. ± 1 livello del titolo
MOG (cellule transfettate) <i>Siero/plasma</i>	Deviazione massima ± 1 livello del titolo	Deviazione massima ± 1 livello del titolo	Deviazione massima ± 1 livello del titolo

Cross-reattività: Non sono state osservate cross-reattività.

Anticorpi contro/ Substrato	Classe Ig	Specificità del campione (anticorpi contro)	n	Prevalenza	
				positivi	%
MOG (cellule transfettate) <i>Siero/plasma</i>	IgG	Mielina	10	0	0%
		SS-A e SS-B	8	0	0%
		SS-A	2	0	0%
		Scl-70	10	0	0%
		Jo-1	10	0	0%
		dsDNA	10	0	0%
		IgLON5	8	0	0%



Interferenza: Campioni emolitici, lipemici ed itterici non hanno dimostrato alcuna influenza sui risultati ottenuti.

Range di riferimento: Titolo 1: <10 (IgG)

Le seguenti prevalenze anticorpali sono state determinate utilizzando un pannello di campioni proveniente da donatori sani (origine: Germania):

Substrato	Anticorpi contro	Coniugato	Prevalenza	Cut-off	Numero di campioni
MOG (cellule transfettate) <i>Siero/plasma</i>	Glicoproteina oligodendrocitaria mielinica (MOG)	IgG	1,9%	1:10	n = 206

Metodo di confronto: specificità e sensibilità: La specificità e la sensibilità del test IFA Anti-MOG sono state analizzate in uno studio interno con un totale di 167 campioni di pazienti, sierologicamente pre-caratterizzati esternamente utilizzando un test in house (60 campioni con pre-caratterizzazione positiva, 107 campioni con pre-caratterizzazione negativa; origine: Germania, Norvegia, Austria, Lussemburgo).

Test di riferimento: Test in-house anti-MOG del Neurological Research Laboratory, University Clinic for Neurology, Medical University Innsbruck, Austria.

Panoramica dei campioni testati:	n = 167
1a. Campioni con informazione del quadro clinico dei pazienti (origine: Norvegia)	14
1b. Campioni senza informazione del quadro clinico (origine: Germania, Lussemburgo)	44
1c. Campioni senza informazione del quadro clinico (origine: Austria)	50
2a. Pannello di controllo: campioni positivi anti-acquaporina-4 (origine: Germania)	9
2b. Campioni provenienti da donatori apparentemente sani (origine: Germania)	50

n = 167		In-house Anti-MOG assay Innsbruck	
		positivi	negativi
EUROIMMUN Anti-Glicoproteina Oligodendrocitaria Mielinica (MOG) IFA	positivi	57	17
	negativi	3	90

Specificità (%)	84,1%
Sensibilità (%)	95,0%
Valore predittivo positivo (%)	77,0%
Valore kappa	0,75

**Sensibilità clinica:**

Si è analizzato un pannello (origine: Germania, Cina, Norvegia) consistente di $n = 72$ pazienti clinicamente caratterizzati con diverse malattie del gruppo dei disturbi dello spettro della neuromielite ottica (NMOSD) e con sintomi clinici individuali per la ricerca degli anticorpi diretti contro MOG.

Gruppo	n	Classe Ig	Anti-MOG IFA	
			Positivi	Prevalenza
Neurite ottica (ON), diverse forme (di cui $n = 22$ con risultato negativo per gli anticorpi anti-AQP-4)	23	IgG	17	74%
Neuromielite ottica (NMO) con risultato negativo per anticorpi anti-AQP-4	1	IgG	0	0%
NMOSD con collagenosi accompagnatoria	45	IgG	0	0%
Neuropatia/paralisi/inflammatione del canale spinale	3	IgG	0	0%

Significato clinico

Il test IFA Anti-**Glicoproteina Oligodendrocitaria Mielinica** permette la determinazione degli autoanticorpi diretti contro la **glicoproteina mielinica degli oligodendrociti** (MOG). Questo test specifico e sensibile si basa su cellule transfettate che esprimono la proteina di lunghezza totale. MOG viene espressa esclusivamente nel sistema nervoso centrale (CNS) sullo strato più esterno della guaina mielinica e sulla membrana plasmatica degli oligodendrociti. Sebbene la proteina da 28 kDa comprenda solo una frazione della guaina mielinica ($<1\%$), essa è un importante marcatore di superficie che è coinvolto, tra le altre cose, nella mielinizzazione dei nervi del CNS. La determinazione degli autoanticorpi diretti contro MOG è di particolare significato nella diagnosi delle malattie da demielinizzazione acquisite del CNS specialmente nei bambini, così come negli adulti con neuromielite ottica (NMO) e malattie dello spettro di NMO (NMOSD). Queste rare malattie neuroinfiammatorie differiscono tipicamente nell'età di comparsa, nel decorso clinico, nella severità della malattia, nelle caratteristiche neuroradiologiche e/o patologiche e nei cambiamenti del liquido cerebrospinale (CSF). Tuttavia, una diagnosi chiara viene spesso effettuata solo retrospettivamente, poiché la diagnosi differenziale è difficile, specialmente alla comparsa della malattia, dovuta alla presentazione parzialmente sovrapposta di simili risultati in MRI, siero e/o CSF. La delimitazione diagnostica della sindrome acuta da demielinizzazione dalla sclerosi multipla (MS) è particolarmente importante, poiché il trattamento per MS e le malattie quali NMO/NMOSD differisce completamente.

La **sclerosi multipla** (MS, encefalomielite disseminata) rappresenta la malattia infiammatoria demielinizzante più frequente del CNS. MS è una malattia cronica del CNS completo che risulta da reazioni autoimmuni dirette contro la guaina mielinica degli assoni. Queste portano a diversi sintomi neurologici. Alla comparsa della malattia, si osservano spesso problemi visivi e parestesia. MS spesso inizia con un sintomo isolato. Questo è riferito come **sindrome clinica isolata** (CIS).

Nella letteratura più recente, il ruolo degli autoanticorpi diretti contro MOG nei pazienti MS è controverso. In studi iniziali, la determinazione degli autoanticorpi diretti contro MOG è stata eseguita utilizzando vari metodi monospecifici basati su domini extracellulari di MOG espressi ricombinatamente o come epitopo lineare o rinaturato. La presentazione degli epitopi utilizzati, in particolare la loro eterogenicità rispetto alla corretta topologia di membrana e/o alla glicosilazione aberrante, ha dato luogo a studi con dati parzialmente contraddittori, con diverse frequenze di anticorpi MOG nei pazienti MS e nei pannelli di controllo. Un importante passo avanti nella comprensione degli autoanticorpi diretti contro MOG si è ottenuto in studi comparativi di pazienti con **encefalomielite acuta disseminata** (ADEM) e pazienti con MS. ADEM rappresenta un'importante diagnosi differenziale da CIS. In contrasto a MS, ADEM è molto più frequente nell'infanzia (<10 anni), presenta coincidenze cronologiche strette con infezioni o vaccinazioni, e generalmente ha un decorso monofasico e complessivamente una prognosi favorevole a lungo termine. Il trattamento anti-infiammatorio precoce con corticosteroidi o plasmaferesi ha una buona percentuale di successo in ADEM.



Al contrario, MS, NMO, le neuriti ottiche ricorrenti (ON) e LETM sono malattie croniche, persistenti che richiedono una terapia immunomodulatoria o immunosoppressiva a lungo termine. Diversi studi che utilizzano cellule transfettate ricombinanti hanno mostrato che titoli elevati di MOG (IgG) si manifestano in una porzione di pazienti con ADEM o CIS ma raramente negli adulti con MS. La sintesi intratecale degli anticorpi MOG è stata mostrata in CIS, ma non in ADEM. In accordo alle più recenti conoscenze, il 30-40% dei pazienti pediatrici con malattie demielinizzanti infiammatorie del SNC mostrano autoanticorpi diretti contro MOG alla comparsa della malattia. Studi longitudinali degli autoanticorpi MOG del siero hanno mostrato che in pazienti con episodi di demielinizzazione acuta (ADEM, CIS) gli autoanticorpi spesso si manifestano solo transitoriamente. Una caduta del titolo è associata con una prognosi più favorevole per ADEM. Gli autoanticorpi persistenti per ADEM sono rari, ma sono stati riportati in pazienti pediatrici con ADEM multifasico, MS o neuriti ottiche ricorrenti. Essi sembrano essere associati con la malattia attiva, progressiva.

La **neuromielite ottica** (NMO) è una malattia cronica autoimmune del CNS con livelli differenti di intensità di malattia (spettro NMO). Gli autoanticorpi diretti contro l'acquaporina-4 (AQP-4), un canale dell'acqua espresso sugli astrociti, rappresentano un bio-marcatore accertato per la malattia. Essi possono essere determinati nel 60 a 90% dei pazienti che soddisfano i criteri diagnostici clinici per NMO. La determinazione degli autoanticorpi diretti contro AQP-4 è specifica per NMO (specificità per NMO: dal 91 al 100%) e anche per le neuriti ottiche ricorrenti (ON) e per la mielite trasversa estensiva longitudinale (LETM) così come per le forme abortive o incomplete di NMO.

Con il test Anti-AQP-4 IFA gli autoanticorpi sono determinati in circa il 70% dei pazienti con NMO. E' anche possibile effettuare la determinazione utilizzando il metodo radioimmunoprecipitazione (RIPA) e il metodo ELISA. Tuttavia, grazie alla bassa sensibilità dei test RIPA e ELISA (circa il 56%) esiste un rischio elevato di risultati falsi negativi. La determinazione più affidabile degli anticorpi diretti contro AQP-4 si raggiunge con sistemi basati su cellule transfettate mediante ricombinazione come substrato antigenico. Il significato principale della determinazione autoanticorpale è che gli autoanticorpi diretti contro AQP-4 (NMO-IgG) permettono la differenziazione sierologica delle NMO prognosticamente povere dalle altre malattie demielinizzanti acute del CNS, quali la classica MS, che può influenzare significativamente le decisioni terapeutiche. Assieme alle sezioni tissutali di CNS, le cellule transfettate con AQP-4 forniscono un Mosaic IFA particolarmente potente, che permette in aggiunta l'analisi delle altre potenziali reattività dirette contro gli antigeni neuronali e gliali nel campione del paziente, ad es., gli anticorpi paraneoplastici.

I titoli degli anticorpi diretti contro AQP-4 sono significativamente più alti nel siero che nel CSF. Al contrario che nell'encefalite da anti-recettore NMDA, nella quale si manifesta la sintesi intratecale degli autoanticorpi, gli anticorpi anti-AQP-4 nel CSF originano dal tessuto linfatico periferico. Questi entrano nel CSF solo quando viene raggiunto un gradiente critico siero-CSF. Ad ora non è stato riportato nessun paziente con siero negativo e CSF positivo.

Gli autoanticorpi AQP-4 sono determinati nel 64,7% dei casi di **malattie da spettro NMO** (NMOSD), sebbene gli autoanticorpi anti-MOG siano trovati solo nel 7,4%. Nei casi NMOSD negativi per AQP-4 la prevalenza è del 21,1%. I pazienti sieronegativi per AQP-4 con un risultato sierologico positivo per MOG hanno più probabilità di avere ON e LETM e spesso mostrano un decorso monofasico. Questi pazienti hanno una buona prognosi connessa con un numero minore di ricorrenze rispetto ai pazienti con un risultato sierologico positivo anti-AQP-4 o ai pazienti doppio negativi (sieronegatività per AQP-4 e MOG). Non è ancora nota una correlazione tra il titolo e la prognosi clinica.

Bibliografia

1. Chou IJ, Whitehouse WP, Wang HS, Tanasescu R, Constantinescu CS. **Diagnostic Modalities in Multiple Sclerosis: Perspectives in Children.** Biomed J 37 (2014) 50-59.
2. EUROIMMUN AG. Stöcker W, Schlumberger W, Krüger C. **Alle Beiträge zum Thema Autoimmundiagnostik und Labordiagnostik der Infektionskrankheiten.** In: Gressner A, Arndt T (Hrsg.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2012).

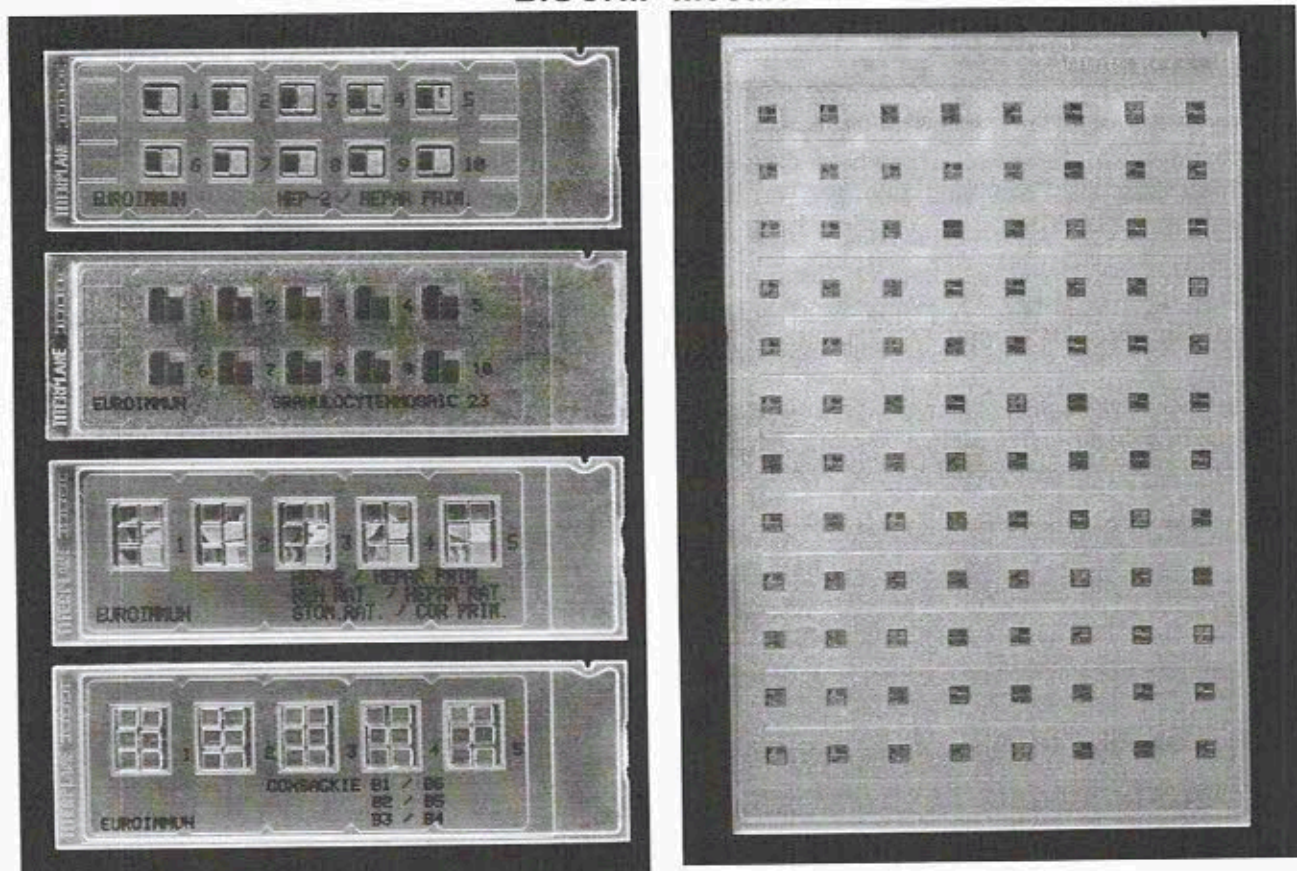


3. Mader S, Deisenhammer F, Reindl M. **Anti-AQP4-Antikörper als Biomarker zur Früherkennung von Neuromyelitis Optica-Spektrum-Erkrankungen / AQP4-IgG antibodies as biomarkers for early diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders.** *Laboratoriumsmedizin* 34 Heft 6 (2010) 337-342.
4. Matthews L, Marasco R, Jenkinson M, Küker W, Luppe S, Leite MI, Giorgio A, De Stefano N, Robertson N, Johansen-Berg H, Evangelou N, Palace J. **Distinction of seropositive NMO spectrum disorder and MS brain lesion distribution.** *Neurology* 80 (2013) 1330-1337.
5. Sato DK, Callegaro D, Lana-Peixoto, Waters PJ, de Haidar FM, Takahashi T, Nakashima I, Apostolos-Pereira SL, Talim N, Simm RF, Martins AM, Misu T, Leite MI, Aoki M, Fujihara K. **Distinction between MOG antibodypositive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders.** *Neurology* 82 (2014) 474-481.
6. Sepúlveda M, Armangué T, Sola-Valls N, Arrambide G, Meca-Lallana JE, Oreja-Guevara C, Mendibe M, Alvarez de Arcaya A, Aladro Y, Casanova B, Olascoaga J, Jiménez-Huete A, Fernández-Fournier M, Ramió-Torrentà L, Cobo-Calvo A, Viñals M, de Andrés C, Meca-Lallana V, Cervelló A, Calles C, Rubio MB, Ramo-Tello C, Caminero A, Munteis E, Antigüedad AR, Blanco Y, Villoslada P, Montalban X, Graus F, Saiz A. **Neuromyelitis optica spectrum disorders: Comparison according to the phenotype and serostatus.** *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016 Apr 14;3(3):e225.
7. Kitley J, Waters P, Woodhall M, Leite MI, Murchison A, George J, Küker W, Chandratte S, Vincent A, Palace J. **Neuromyelitis optica spectrum disorders with aquaporin-4 and myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies: a comparative study.** *JAMA Neurol.* 2014 Mar;71(3):276-83. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.5857.
8. Titulaer MJ, Höftberger R, Iizuka T, Leypoldt F, McCracken L, Cellucci T, Benson LA, Shu H, Irioka T, Hirano M, Singh G, Cobo Calvo A, Kaida K, Morales PS, Wirtz PW, Yamamoto T, Reindl M, Rosenfeld MR, Graus F, Saiz A, Dalmau J. **Overlapping demyelinating syndromes and anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis.** *Ann Neurol.* 2014 Mar;75(3):411-28.
9. Höftberger R, Sepulveda M, Armangué T, Blanco Y, Rostásy K, Cobo Calvo A, Olascoaga J, Ramió-Torrentà L, Reindl M, Benito-León J, Casanova B, Arrambide G, Sabater L, Graus F, Dalmau J, Saiz A. **Antibodies to MOG and AQP4 in adults with neuromyelitis optica and suspected limited forms of the disease.** *Mult Scler.* 2015 Jun;21(7):866-74.
10. Martínez-Hernández E, Sepulveda M, Rostásy K, Höftberger R, Graus F, Harvey RJ, Saiz A, Dalmau J. **Antibodies to aquaporin 4, myelin-oligodendrocyte glycoprotein, and the glycine receptor $\alpha 1$ subunit in patients with isolated optic neuritis.** *JAMA Neurol.* 2015 Feb;72(2):187-93.
11. Hacohen Y, Absoud M, Deiva K, Hemingway C, Nytrova P, Woodhall M, Palace J, Wassmer E, Tardieu M, Vincent A, Lim M, Waters P. **Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies are associated with non-MS course in children.** *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015 Mar 12;2(2):e81.
12. Pröbstel AK, Dornmair K, Bittner R, Sperl P, Jenne D, Magalhaes S, Villalobos A, Breithaupt C, Weissert R, Jacob U, Krumbholz M, Kuempfel T, Blaschek A, Stark W, Gärtner J, Pohl D, Rostasy K, Weber F, Forne I, Khademi M, Olsson T, Brilot F, Tantsis E, Dale RC, Wekerle H, Hohlfeld R, Banwell B, Bar-Or A, Meinl E, Derfuss T. **Antibodies to MOG are transient in childhood acute disseminated encephalomyelitis.** *Neurology.* 2011 Aug 9;77(6):580-8.
13. Brilot F, Dale RC, Selter RC, Grummel V, Kalluri SR, Aslam M, Busch V, Zhou D, Cepok S, Hemmer B. **Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in children with inflammatory demyelinating central nervous system disease.** *Ann Neurol.* 2009 Dec;66(6):833-42.
14. Majed M, Fryer JP, McKeon A, Lennon VA, Pittock SJ. **Clinical utility of testing AQP4-IgG in CSF.** *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* June 2016 vol. 3 no. 3 e231.



15. Wingerchuck DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, de Seze J, Greenberg B, Jacob A, Jarius S, Lana-Peixoto M, Levy M, Simon JH, Tenenbaum S, Traboulsee AL, Waters P, Wellik KE, Weinshenker BG. **International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders**. Neurology. 2015 Jul 14;85(2):177-89.
16. EUROIMMUN AG. Stöcker W, Rottmann N. **Verfahren und Analysevorrichtung zur mikroskopischen Untersuchung eines Gewebeschnittes oder eines Zellausstriches**. Deutsche und Internationale Patentanmeldung DE 10 2012 013 678 (angemeldet 2012) und WO2014/009066 (angemeldet 2013).
17. EUROIMMUN AG. Stöcker W, Rottmann N. **Verfahren sowie Vorrichtung zur Inkubation von Patientenproben**. Deutsche und Internationale Patentanmeldung DE 10 2012 013 680 (angemeldet 2012) und WO2014/009067 (angemeldet 2013).

BIOCHIP Mosaic®



I vetrini per immunofluorescenza indiretta possono essere prodotti in singoli substrati o in Mosaici® di BIOCHIP fino a 60 differenti substrati a seconda delle vostre richieste specifiche. Ghiandola surrenale, vescica (ratto), tronco encefalico, cartilagine*, cervelletto, cervello, colon, Crithidia lucillae sensibile, occhio, F-actina (VSM47), granulociti (fissati con EOH, HCHO o MOH), muscolo cardiaco, cellule Hep-2, cellule Hep-20-10, ippocampo, HUVEC, ipotalamo*, orecchio interno (ratto)*, cellule calciformi intestinali, digiuno, rene (primate, ratto, topo), ghiandola lacrimale*, granulociti lattotterina-specifici, labbra*, lipociti*, fegato (primate, ratto, topo), polmone*, infociti, smammella*, monociti*, mucosa buccale*, esofago (primate, ratto), nervo ottico (AQP-4, NMO IgG), ovaio, pancreas, ghiandola paratiroidea, parotide, nervo periferico, placenta*, ipofisi, ponte di varolio*, prostata*, salt-split skin, muscolo scheletrico, spermatozoi, midollo spinale, stomaco (primate, ratto, topo), sostanza nigra*, testicolo, trombociti, timo*, ghiandola tiroidea, lingua, cordone ombelicale, vescicole seminali* ecc. Adenovirus, Bartonella henselae, B. quintana, Bordetella parapertussis, B. pertussis, Borrelia afzelii, B. burgdorferi (ceppi CH, USA), B. garinii, Campylobacter coli*, C. jejuni, Candida albicans, C. glabrata*, C. krusei*, C. parapsilosis*, C. tropicalis*, Chikungunya virus, Chlamydia pneumoniae, C. trachomatis, C. psittaci, CMV, Coxsackievirus (A7, A9, A16, A24, da B1 a B6), Dengue virus tipi da 1 a 4, EBV-CA, EBNA, EBV-EA, Echinococcus granulosus, ECHO virus, hantavirus, Haemophilus influenzae*, Helicobacter pylori, HHV-6, HSV-1, HSV-2, Influenza virus A (ceppi H3N2, H1N1, H5N1), Influenza virus B, virus dell'encefalite giapponese, Klebsiella pneumoniae*, Legionella bozemanii*, L. dumoffii*, L. gormanii*, L. jordanii*, L. longbeachae, L. micdadei*, L. pneumophila (sierotipi da 1 a 14), Leishmania donovani, Listeria monocytogenes (ceppi 1/2a, 4b)*, virus del morbillo, virus della parotite, M. pneumoniae, Parainfluenza virus tipi da 1 a 4, virus della febbre Rift-Valley, RSV, virus della rosolia, Saccharomyces cerevisiae, virus della febbre da mosca della sabbia, SARS-CoV, Schistosoma mansoni, Sindbis virus*, TBE virus, TO.R.C.H. profile, Toxoplasma gondii, Treponema pallidum, T. phagedaenis, usutu virus*, VZV, West Nile virus, virus della febbre gialla, Yersinia enterocolitica (O:3, O:4, O:6 and O:9)*. **EUROPLUS:** Hep-2/fegato + RNP/Sm, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, proteine P ribosomiali, Jo-1; granulociti + MPO, PR3; stomaco di primate (cellule parietali) + fattore intrinseco; fegato di primate (endomysio) + gliadina (GAF-3X); rene di ratto + AMA M2; ghiandola tiroidea + tireoglobulina; glomeruli renali e tubuli + GBM; BP180 (NC16A-4X); Borrelia burgdorferi e afzelii + OspC e VlsE; EBV-CA + gp125 + p19; Plasmodium falciparum (HRP-2, MSP-2). **Cellule transfettate:** AQP-4, BP230gc, collagene VII, desmogleina 1+3, envoplachina*, GABABR, GAD65, recettori del glutammato (tipo NMDA, AMPA), recettori della glicina*, PLA2R, rPAg 1+2 (antigene pancreatico1+2), VGKC (CASPR2, LGI1), virus della febbre della Crimea-Congo (GPC, N).

*Attualmente non disponibili nell'Unione Europea.

ATTESTAZIONE DI VERIFICA E REGISTRAZIONE CONTABILE

relativa alla DELIBERAZIONE DEL DIRETTORE GENERALE con oggetto:

FORNITURA DI PRODOTTI UOC PATOLOGIA CLINICA EX DEL. N.185/2019 - “LOTTO N.3 “PROFILI DIAGNOSTICI IMMUNOBLOT” - PROVVEDIMENTI

ATTESTAZIONE DI VERIFICA E REGISTRAZIONE CONTABILE 1 (per le proposte che determinano un costo per l'AORN)

Il costo derivante dal presente atto : €7.049,98

- è di competenza dell'esercizio 2021 , imputabile al conto economico 5010105010 - Dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD) da scomputare dal preventivo di spesa 9/12 che presenta la necessaria disponibilità
- è relativo ad acquisizione cespiti di cui alla Fonte di Finanziamento

ATTESTAZIONE DI VERIFICA E REGISTRAZIONE CONTABILE 2 (per le proposte che determinano un costo per l'AORN)

Il costo derivante dal presente atto : €2.349,99

- è di competenza dell'esercizio 2022 , imputabile al conto economico 5010105010 - Dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD) da scomputare dal preventivo di spesa 3/12 che presenta la necessaria disponibilità
- è relativo ad acquisizione cespiti di cui alla Fonte di Finanziamento

Caserta li, 07/04/2021

il Direttore
UOC GESTIONE ECONOMICO FINANZIARIA
Eduardo Scarfiglieri