AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

MANUALE DI ISTRUZIONI

AESKUSLIDES® ANCA

Ref 54.xxx

CE

AESKU.DIAGNOSTICS THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS	Rif. prodotto:	54.xxx
	Desc. prodotto:	ANCA
	N. rev. manuale:	018:2026-06-12

AESKUSLIDES®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



eIFU
WWW.AESKU.COM

Istruzioni per l'uso

ANCA

Rif. standard	Descrizione	Test
54.100	**ANCA Ethanol** (12 pozzetti)	120
54.101	**ANCA Formalin** (12 pozzetti)	120
54.050	**ANCA Ethanol** (6 pozzetti)	60
54.051	**ANCA Formalin** (6 pozzetti)	60

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

Indice dei contenuti

1. USO PREVISTO 1
2. APPLICAZIONE CLINICA 1
3. PROCEDURA DEL KIT 3
4. INTERPRETAZIONE 3
5. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI SPECIFICHE 3
5.1 Sensibilità/Specificità 3
5.2 Riproducibilità e accuratezza 4
6. SCHEDA DI INTERPRETAZIONE DEI DATI 5
7. CONTENUTO DEI KIT STANDARD 6
8. CONTENUTO DEI REAGENTI COMUNI 7
a. Reagenti comuni 7
b. Materiale occorrente, ma non fornito 7
9. Conservazione e validità 8
10. Precauzioni d'uso 8
c. Rischi per la salute 8
d. Istruzioni d'uso generali 8
11. Raccolta, preparazione e conservazione dei campioni 9
12. Esecuzione del test 9
e. Preparazione 9
f. Procedura 10
g. Flusso di lavoro 11
13. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI 12
14. SIMBOLI NORMATIVI 13

ANCA

1. USO PREVISTO

***AESKUSLIDES*® ANCA** è un test di immunofluorescenza indiretta per la rilevazione di autoanticorpi anticitoplasma dei neutrofili (ANCA) nel siero umano.

Il test viene utilizzato per la diagnosi differenziale di vasculiti ANCA associate (AAV), come la granulomatosi con poliangite (di Wegener)[1], la poliangite microscopica e la sindrome di Churg-Strauss.

2. APPLICAZIONE CLINICA

L'acronimo ANCA (autoanticorpi anticitoplasma dei neutrofili) indica un gruppo di anticorpi diretti contro diverse componenti dei granulociti neutrofili e dei monociti. Fino ad oggi, il metodo utilizzato per la rilevazione degli ANCA è stato il test di immunofluorescenza indiretta con neutrofili fissati in etanolo, in cui si evidenziava come, sui neutrofili fissati in etanolo, alcuni ANCA creano un pattern di fluorescenza citoplasmatica (quindi definiti C-ANCA), mentre altri creano un pattern perinucleare (i P-ANCA). Siccome entrambi i pattern possono essere associati ad antigeni multipli, l'immunofluorescenza non è sufficiente per una diagnosi differenziale soddisfacente della vasculite e, quindi, ogni test ad immunofluorescenza (IFT) dovrebbe essere verificato con test ELISA specifici[2,3].

Alcuni ANCA danno origine ad un pattern di fluorescenza atipico (gli A-ANCA) la cui differenziazione da un pattern generato da anticorpi antinucleo (ANA) su neutrofili fissati in etanolo può risultare difficile dal punto di vista tecnico. Per riuscire ad ottenere tale differenziazione, vengono utilizzati neutrofili fissati in formalina. Gli ANCA che danno origine ad una colorazione tipo P-ANCA/A-ANCA sui neutrofili fissati in etanolo mostreranno un pattern citoplasmatico se come base vengono utilizzati i neutrofili fissati in formalina. Se il pattern di colorazione diventasse negativo, dovrebbe essere effettuato il test degli ANA con cellule HEp-2[4].

La mieloperossidasi (MPO) è stata identificata come il principale antigene P-ANCA (MPO-ANCA). La colorazione perinucleare può essere causata anche da altri componenti cellulari, come la lattoferrina, la catepsina G e l'elastasi, che vengono quindi inclusi nel gruppo dei P-ANCA. Tuttavia, tali componenti non sono associati in modo specifico agli AAV e potrebbero essere utilizzati nella diagnosi differenziale di altre patologie non vasculitiche[5].

Per contro, la proteinasi 3 è il principale antigene bersaglio dei C-ANCA (PR3-ANCA)[6]. Un altro

[1] Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman GS, Jayne DR, Jennette JC et al. Granulomatosis with Polyangiitis (Wegener's): An alternative name for Wegener's Granulomatosis. Arthritis Rheum 2011; 63: 863-864.
[2] Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). Am J Clin Pathol 1999; 111: 507-513.
[3] Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC et al. Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. Am J Clin Pathol 2003; 120: 312-318.
[4] Csernok E, Holle JU. Twenty-eight years with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): how to test for ANCA – evidence-based immunology? Autoimmun Highlights 2010; 1: 39-43.
[5] Wiik A, Stummann L, Kjeldsen L, Borregaard N, Ullman S, Jacobsen S et al. The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens. Clin Exp Immunol 1995; 101 Suppl 1: 15-17.
[6] Gross WL, Csernok E, Helmchen U. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigens, and systemic vasculitis. APMIS 1995; 103: 81-97.

antigene che può originare C-ANCA è la BPI (proteina battericida che incrementa la permeabilità)[7].

Gli ANCA sono identificati frequentemente in pazienti affetti da poliangite microscopica (60 % MPO-ANCA, 30 % PR3-ANCA) e in pazienti con sindrome di Churg-Strauss (30 % MPO-ANCA, 30 % PR3-ANCA)[8]. Gli anticorpi per la PR3 sono marker sierologici specifici della granulomatosi con poliangite (di Wegener), in cui dal 50 % (patologia localizzata) al 95 % (patologia generalizzata) dei casi sono presenti i PR3-ANCA[9].

Gli anticorpi contro gli altri antigeni rilevanti per gli ANCA, come la lattoferrina, la catepsina G, l'elastasi e la BPI sono stati associati ad una grande varietà di patologie e una loro chiara rilevanza clinica è ancora oggetto di studio[4]. Nei casi di anticorpi antielastasi, è stata evidenziata una correlazione con le lesioni distruttive del palato da abuso di cocaina (CIMDL)[10].

Caratteristiche dell'antigene: neutrofili umani (granulociti) fissati in etanolo o in formalina

Cross-reattività: come descritto nella sezione sull'applicazione clinica, la presenza di ANA può originare pattern di fluorescenza che possono essere confusi con un P-ANCA/A-ANCA. In caso contrario, non è presente nessun'altra cross-reattività.

La rilevazione degli anticorpi è basata sul principio del test di immunofluorescenza indiretta (IIFA). Sui vetrini per microscopio vengono distribuite sezioni di tessuto o cellule (cellule HEp-2 -ANA-, granulociti –ANCA- o *Crithidia luciliae* –nDNA-). Se contenuti nel siero del paziente, gli anticorpi specifici si legheranno durante la prima incubazione. In seguito alla rimozione del materiale non legato tramite il lavaggio, durante la seconda incubazione gli anticorpi legati sono evidenziati dalle immunoglobuline antiumane coniugate con fluoresceina. Tramite un microscopio a fluorescenza è possibile visualizzare una specifica colorazione verde fluorescente del complesso antigene-anticorpo.

[7] Zhao MH, Jones SJ, Lockwood CM. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. Clin Exp Immunol 1995; 99: 49-56.
[8] Bosch X, Guilabert A, Font J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. Lancet 2006; 368: 404-418.
[9] Holle JU, Csernok E, Gross WL. Wegener Granulomatosis. 2008; In: Diagnostic Criteria in autoimmune Diseases, Shoenfeld Y, Cervera R, and Gershwin ME, eds. Humana Press, pp. 99-102.
[10] Wiesner O, Russell KA, Lee AS, Jenne DE, Trimarchi M, Gregorini G et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with human neutrophil elastase as a diagnostic marker for cocaine-induced midline destructive lesions but not autoimmune vasculitis. Arthritis Rheum 2004; 50: 2954-2965.

3. PROCEDURA DEL KIT

Per istruzioni dettagliate, consultare la procedura del test contenuta nel Manuale Comune, sezione 11. Usare i seguenti dati per i kit ANCA:

- Incubazione colorazione di contrasto: da 30-90 secondi
- Titolo di screening consigliato:
  - 1:20

4. INTERPRETAZIONE

Gli anticorpi anticitoplasma dei neutrofili (ANCA) sono di primaria importanza clinica nel valutare disordini vascolari nel paziente.

Il titolo finale adatto è quello in cui il siero del paziente mostra una colorazione positiva semplice. Una fluorescenza debole con titoli tra 1:20 e 1:80 o vaghezza rispetto ai risultati clinici dovrebbero essere controllati tramite monitoraggio, raccogliendo i campioni circa ogni 3 settimane e testandoli in modo analogo.

1:20	25 µL siero	+	475 µL tampone campione
1:40	20 µL siero	+	780 µL tampone campione (rispettivamente 1:2 della diluizione "1:20")
1:80	10 µL siero	+	790 µL tampone campione (rispettivamente 1:2 della diluizione "1:40")
1:160	10 µL siero	+	1590 µL tampone campione (rispettivamente 1:2 della diluizione "1:80")

Ect.

Il classico pattern C-ANCA caratterizzato da una colorazione citoplasmatica granulare e omogenea con una colorazione minima nell'area del nucleo.

Pattern P-ANCA con una colorazione perinucleare delineata nettamente (neutrofili fissati in etanolo) o pattern citoplasmatico C-ANCA (neutrofili fissati in formalina).

5. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI SPECIFICHE

5.1 Sensibilità/Specificità

***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** e **ANCA Formalin** sono stati confrontati con altri sistemi di immunofluorescenza indiretta disponibili in commercio utilizzando neutrofili fissati in etanolo e formalina. 132 sieri di pazienti affetti da vasculite ANCA-associata e 375 sieri da pazienti con altre malattie (controlli non sani) sono stati analizzati manualmente e valutati da due lettori. Per determinare i campioni positivi è stata utilizzata una diluizione di cut-off di 1:20. I campioni clinici rappresentavano lo spettro completo delle malattie autoimmuni.

Risultati del confronto per ANCA Ethanol:

		Equivalente		
		Risultato positivo	Risultato negativo	Totale
AESKUSLIDES® ANCA Ethanol	Risultato positivo	145	34	179
	Risultato negativo	71	257	328
	Totale	216	291	507

Sensibilità = 145/216 = 67,1 % (IC 95%: 60,6-73,0 %)
Specificità = 257/291 = 88,3 % (IC 95%: 84,1-91,5 %)

Risultati del confronto per ANCA Formalin:

		Equivalente		
		Risultato positivo	Risultato negativo	Totale
***AESKUSLIDES*® ANCA Formalin**	**Risultato positivo**	66	35	101
	Risultato negativo	16	390	406
	Totale	82	425	507

Sensibilità = 66/82 = 80,5 % (IC 95%: 70,6-87,6 %)
Specificità = 390/425 = 91,8 % (IC 95%: 88,8-94,0 %)

Gli intervalli di confidenza al 95% sono intervalli di confidenza del punteggio secondo Wilson[11].

5.2 Riproducibilità e accuratezza

Per dimostrare la riproducibilità del test ***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** e **ANCA Formalin** sono stati condotti studi intra-laboratorio e inter-lotto. Otto campioni di siero sono stati testati con ***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol**. Per ***AESKUSLIDES*® ANCA Formalin** sono stati utilizzati dieci campioni. Il set di campioni, inclusi i campioni negativi e quelli a positività bassa, media e alta rappresentativi dei due diversi pattern (P-ANCA e C-ANCA), sono stati processati manualmente e con il sistema automatico per test di immunofluorescenza **HELIOS® Automated IFA System**, e valutati da due lettori. Per gli studi inter-laboratorio e fra laboratori i campioni sono stati testati per cinque giorni, con due analisi al giorno e tre repliche per analisi, in tre centri. Per dimostrare le variabilità inter-lotto di ***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** e **ANCA Formalin** i campioni sono stati testati in dieci repliche su kit di tre lotti diversi. Le concordanze positiva e negativa sono risultate essere ≥ 90%. I campioni hanno mostrato pattern e intensità di fluorescenza coerenti in tutti i pozzetti testati.

[11]Wilson, E. B. (1927). Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. Journal of the American Statistical Association, 22(158), 209–212. https://doi.org/10.2307/2276774

6. SCHEDA DI INTERPRETAZIONE DEI DATI

ANCA

Data:	Lotto:	Fissaggio ethanol: ☐ formalin: ☐
Vetrino N°:	Operatore:	

Pozzetto n.	ID	Fattore di diluizione	F.I.	nucleoplasma	citoplasma	autoanticorpi	osservazioni
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							

7. CONTENUTO DEI KIT STANDARD

		VETRINI				CONIUGATO			CONTROLLO POSITIVO		
Rif. kit	**Descrizione kit**	**Rif.**	**Pozzetti**	**Ricoperti con**	**Quantità**	**Rif.**	**Descrizione**	**Quantità**	**Rif.**	**Descrizione**	**Quantità**
54.100	**ANCA Ethanol (12 pozzetti)**	**S54.100**	12	neutrofili umani (fissaggio in etanolo)	10	**C54.100**	**IgG** Tappo blu: soluzione di colore blu chiaro. Contenente: BSA, Tween, fluoresceina (FITC) etichettata antiumana Anticorpo	1x 4,8 ml	**PC54.100**	Pattern ANCA controllo C-ANCA Tappo rosso: soluzione incolore. Contenente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
									PC54.101	Pattern ANCA controllo P-ANCA Tappo rosso: soluzione incolore. Contenente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	
54.101	**ANCA Formalin (12 pozzetti)**	**S54.101**	12	neutrofili umani (fissaggio in formalina)	10	**C54.101**	**IgG** Tappo blu: soluzione di colore blu chiaro. Contenente: BSA, Tween, fluoresceina (FITC) etichettata antiumana Anticorpo	1x 4,8 ml	**PC54.100**	Pattern ANCA controllo C-ANCA Tappo rosso: soluzione incolore. Contenente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
									PC54.101	Pattern ANCA controllo P-ANCA Tappo rosso: soluzione incolore. Contenente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	
54.050	**ANCA Ethanol (6 pozzetti)**	**S54.050**	6	neutrofili umani (fissaggio in etanolo)	10	**C54.050**	**IgG** Tappo blu: soluzione di colore blu chiaro. Contenente: BSA, Tween, fluoresceina (FITC) etichettata antiumana Anticorpo	1x 2,4 ml	**PC54.100**	Pattern ANCA controllo C-ANCA Tappo rosso: soluzione incolore. Contenente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
									PC54.101	Pattern ANCA controllo P-ANCA Tappo rosso: soluzione incolore. Contenente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	
54.051	**ANCA Formalin (6 pozzetti)**	**S54.051**	6	neutrofili umani (fissaggio in formalina)	10	**C54.051**	**IgG** Tappo blu: soluzione di colore blu chiaro. Contenente: BSA, Tween, fluoresceina (FITC) etichettata antiumana Anticorpo	1x 2,4 ml	**PC54.100**	Pattern ANCA controllo C-ANCA Tappo rosso: soluzione incolore. Contenente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
									PC54.101	Pattern ANCA controllo P-ANCA Tappo rosso: soluzione incolore. Contenente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	

NOTA: il contenuto degli altri componenti dei kit, ad esempio reagenti comuni (controllo negativo, liquido di montaggio ecc.), è descritto di seguito nella sezione 8 CONTENUTO DEI REAGENTI.

8. CONTENUTO DEI REAGENTI COMUNI

a. Reagenti comuni

Rif.	Reagente	Quantità / Volume		Descrizione	Pronto all'uso
NCANCA	Controllo negativo	1x	0,5 ml	Tappo verde: soluzione incolore. Componente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	SÌ
*** EBIFA**	Blu Evans 0,2 %	1x	1,5 ml	Tappo bianco: soluzione di colore blu. Componente: PBS, blu Evans. Diluire il blu Evans allo 0,2 % 1:3000 in 1 x WBIFA	NO
MMIFA	Liquido di montaggio	1x	8 ml	Omologato per l'uso con HELMED® Tappo bianco: soluzione incolore Componente: PBS, glicerina.	SÌ
WBIFA	Tampone di lavaggio (10x)	1x	100 ml	Tappo bianco: soluzione incolore Diluire 1:10 con acqua distillata il tampone concentrato (es. 100 ml + 900 ml). Contenente: PBS, sodio azide (conservante).	NO
SBIFA	Tampone campione	1x	70 ml	Tappo bianco: soluzione incolore per la diluizione del siero del paziente Contenente: PBS BSA, sodio azide (conservante).	SÌ

Le quantità si riferiscono al singolo kit. (*) devono essere ordinati separatamente

b. Materiale occorrente, ma non fornito

1. Acqua distillata
2. Provette da test per la diluizione dei campioni
3. Beuta
4. Pipetta volumetrica
5. Timer
6. Microscopio a fluorescenza con sistema FITC (filtro di eccitazione 490 nm, filtro di sbarramento 510 nm)
7. Camera umida
8. Cuvetta
9. Puntali
10. Coprioggetto (24 x 60 mm)
11. spremere flacone di lavaggio

Se le informazioni sul prodotto, etichette incluse, risultassero mancanti o inesatte contattare il produttore o il fornitore del kit.

9. Conservazione e validità

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C / 35,6-46,4 °F al riparo dalla luce intensa. La data di scadenza di ciascun componente è riportata sulla rispettiva etichetta. Non usare i reagenti dopo la data di scadenza.

Conservare tutti i reagenti e i vetrini a 2-8 °C / 35,6-46,4 °F nel contenitore originale. Dopo la preparazione, le soluzioni sono stabili per almeno una settimana a 2-8 °C / 35,6-46,4 °F. **I reagenti e i vetrini devono essere usati entro la data di scadenza indicata su ciascun componente.**

10. Precauzioni d'uso

c. Rischi per la salute

QUESTO PRODOTTO È DESTINATO ESCLUSIVAMENTE ALL'USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Il kit deve essere utilizzato solo da parte di personale esperto e specificamente addestrato nelle metodiche di diagnostica in vitro. Il presente prodotto non è considerato tossico o pericoloso in condizioni di utilizzo conforme all'uso previsto; tuttavia, per garantire la massima sicurezza, si rimanda a quanto segue

Raccomandazioni e precauzioni

Il kit contiene componenti potenzialmente nocivi. Benché i reagenti del kit non siano classificati come irritanti per gli occhi e la cute, si raccomanda di evitare il contatto con gli occhi e con la cute e di indossare guanti monouso.

Tutti i materiali di origine umana utilizzati per alcuni reagenti del presente kit (ad es. i controlli) sono stati testati con metodi approvati e sono risultati negativi per HBsAg, epatite C e HIV. Tuttavia, nessun test può garantire con assoluta certezza l'assenza di agenti virali in tali materiali. Pertanto, i reagenti di controllo del kit e i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infettivi e maneggiati in accordo con le normative nazionali.

Il kit contiene materiale di origine animale (BSA, Immunoglobuline) come indicato nella tabella dei contenuti, gestire in base alle esigenze nazionali.

d. Istruzioni d'uso generali

1. Non pipettare con la bocca. Non fumare, mangiare o bere durante l'utilizzo del kit.
2. Non mescolare o sostituire reagenti di lotti differenti, perché ciò può alterare i risultati.
3. Dopo l'uso, chiudere con cura tutti i flaconi, per evitare contaminazioni batteriche.
4. Pipettare sempre tutte le soluzioni con nuovi puntali sterili.
5. Non esporre i componenti a temperature superiori a 37 °C / 98,6 °F (tranne MMIFA).
6. Durante l'intera procedura, non lasciar asciugare i pozzetti dei vetrini.
7. Non congelare i vetrini.

Ogni laboratorio dovrebbe determinare i propri valori di riferimento in base alle proprie metodiche, ai propri controlli, alle attrezzature impiegate e alla popolazione di pazienti.

La diagnosi clinica definitiva non deve basarsi esclusivamente sui risultati del test condotto, ma anche sulla valutazione di tutti i referti clinici e di laboratorio da parte del medico.

Nel caso in cui i valori dei controlli non corrispondano ai criteri, il test non è valido e va ripetuto. Eseguire i seguenti controlli: le date di scadenza dei reagenti (preparati), le condizioni di magazzinaggio, le pipette, i dispostivi, il fotometro, le condizioni di incubazione e i metodi di lavaggio.

Nel caso in cui i risultati dei seguenti controlli non presentino alcun valore anormale o alcun tipo di deviazione, rivolgersi al produttore o al fornitore del test kit.

11. Raccolta, preparazione e conservazione dei campioni

Utilizzare preferibilmente campioni di siero freschi. Il prelievo di sangue deve avvenire in conformità con le normative nazionali. Effettuare i prelievi di sangue in condizioni asettiche.

I campioni lipemici, itterici, emolitici o contaminati con batteri possono causare interferenze.

Eventuali particelle presenti nel siero devono essere eliminate tramite centrifugazione a bassa velocità (<1000 x g). I campioni di sangue devono essere raccolti in provette pulite, asciutte e vuote. Dopo la separazione, i campioni di siero devono essere utilizzati immediatamente durante le prime otto ore, conservati ben chiusi a 2-8 °C / 35,6-46,4 °F per un massimo di 2 settimane oppure congelati a -20 °C / -4 °F per periodi più lunghi. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni.

12. Esecuzione del test

e. Preparazione

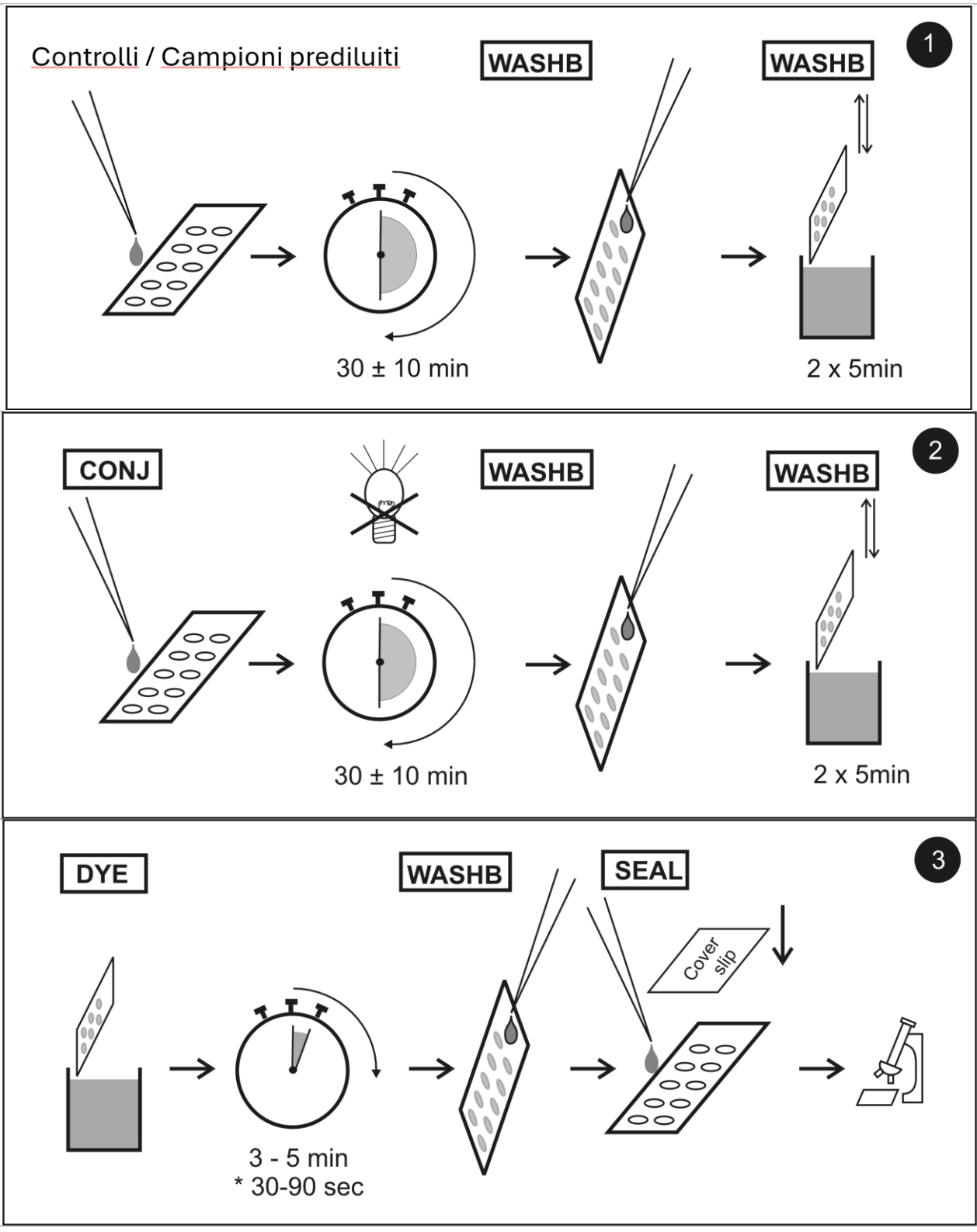
Prima dell'uso, attendere che tutti i componenti abbiano raggiunto la temperatura ambiente (20-26 °C / 68-78,8 °F), mescolare con cura e attenersi allo schema di incubazione raccomandato per una performance ottimale del test.

1. Preparazione del tampone di lavaggio: Diluire 1:10 con acqua distillata il tampone concentrato.
2. Diluizione dei campioni: Diluire i sieri paziente (per il titolo di screening fare riferimento alla sezione ***Principio del test*** più adatta in base al prodotto in uso) con tampone campione 1x. Il titolo varia a seconda del test HEp-2, nDNA, rLKS, EMA ecc.
3. I controlli sono pronti per l'uso.
4. Preparazione di un protocollo: le schede di interpretazione dati sono disponibili nella sezione ***Principio del test*** più adatta in base al prodotto in uso.
5. In caso di aumento della viscosità e/o dell'opacità, riscaldare il reagente del mezzo di montaggio (MMIFA) in bagno termostatico per 15 minuti a 56 °C / 132,8 °F, quindi riportarlo a temperatura ambiente 20-26 °C / 68–78,8 °F prima dell'uso. Dopo questa procedura, il reagente riscaldato può essere utilizzato per un massimo di 21 giorni consecutivi, a condizione che sia conservato a una temperatura compresa tra 2-8 °C / 35,6-46,4 °F), come specificato sull'etichetta del reagente e nelle istruzioni per l'uso.

f. Procedura

N°	Descrizione
1.	Estrarre i vetrini necessari dalla confezione e contrassegnarli. Non toccare i pozzetti. Non las ciar asciugare i vetrini.
2.	**Preparazione del Camera umida:** Dispensare un piccolo volume di acqua distillata o deionizzata in un vassoio di incubazione e inserire i vetrini sui supporti del vassoio stesso. Incubare i vetrini per 30 ± 10 minuti a temperatura ambiente nel vassoio di incubazione umidificato. Utilizzare tempi di incubazione coerenti per il coniugato **Prima incubazione:** Pipettare un volume adeguato di ciascun siero diluito e dei controlli (pronti per l'uso) nei rispettivi pozzetti, evitando il contatto diretto della pipetta con la superficie del vetrino. Verificare che ogni pozzetto sia completamente coperto dal siero corrispondente. È importante utilizzare una quantità di materiale sufficiente per coprire interamente il pozzetto. Evitare, però, che i sieri di pozzetti differenti si mescolino, perché ciò può essere causa di risultati errati.
3.	**Lavaggio:** Dopo l'incubazione rimuovere i vetrini dal vassoio di incubazione e lavare brevemente con tampone di lavaggio utilizzando una bottiglia con spruzzetta. Non spruzzare direttamente sui pozzetti. NOTA: Per evitare contaminazioni inclinare il vetrino lateralmente da una parte e spruzzare la soluzione di lavaggio lungo la linea mediana del vetrino stesso. Ripetere la stessa procedura inclinando il vetrino dalla parte opposta. Lavare il vetrino per 10 minuti con soluzione di lavaggio in un apposito contenitore. Evitare il contatto del substrato con parti solide. Per risultati ottimali cambiare la soluzione di lavaggio una volta dopo 5 minuti. Togliere i vetrini dal contenitore e rimuovere la soluzione di lavaggio in eccesso. NOTA: E' importante che i pozzetti non rimangano mai asciutti durante la procedura di preparazione, altrimenti si danneggerebbe il substrato.
4.	**Seconda incubazione**: Dopo il lavaggio, riporre immediatamente il vetrino portaoggetto nella camera umida e coprire ogni pozzetto con una quantità sufficiente di coniugato FITC pronto per l'uso, in modo tale che il pozzetto risulti interamente coperto. Incubare i vetrini per 30 ± 10 minuti a temperatura ambiente al buio.
5.	**Lavaggio:** Dopo l'incubazione rimuovere i vetrini dal vassoio di incubazione e lavare brevemente con tampone di lavaggio utilizzando una bottiglia con spruzzetta. Non spruzzare direttamente sui pozzetti. Lavare il vetrino per 10 minuti con soluzione di lavaggio in un apposito contenitore. Per risultati ottimali cambiare la soluzione di lavaggio una volta dopo 5 minuti.
6.	**Colorazione di contrasto facoltativa**: Diluire il colorante di contrasto (blu Evans) 1:3000 in tampone di lavaggio e miscelare con cura. Inclinare il colorante di contrasto nella cuvetta e incubarvi i vetrini. Per informazioni dettagliate sui tempi di incubazione, fare riferimento alla sezione ***Principio del test*** più adatta in base al prodotto in uso. Il blu Evans copre la fluorescenza aspecifica di fondo. Trascorso il tempo di incubazione, prelevare il vetrino e lavarlo brevemente con soluzione di lavaggio. Eliminare con cautela l'eccesso di soluzione di lavaggio rimasta sul vetrino. Non tamponare i vetrini su carta assorbente ed evitarne l'essicazione.
7.	**Montaggio**: Aggiungere un volume adeguato di mezzo di montaggio al centro di ciascun vetrino. Coprire con attenzione con il coprioggetto, evitando la formazione di bolle d'aria.
8.	**Microscopia**: Esaminare immediatamente i vetrini con ingrandimento 400–800 x al microscopio a fluorescenza (filtro di eccitazione 490 nm, filtro di sbarramento 510 nm).

g. Flusso di lavoro



13. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

ERRORE	CAUSE POSSIBILI	SOLUZIONE
Bassa densità cellulare	• Lisi cellulare dovuta al contatto prolungato con acqua deionizzata. • Tampone spruzzato direttamente sul substrato del pozzetto	Attenersi alla procedura di lavaggio descritta
	Enzimi proteolitici hanno attaccato il substrato	nattivare il siero
Fluorescenza non omogenea	Siero seccato nel pozzetto, fluorescenza più intensa al margine	Incubare sempre in ambiente umido
	Il siero non ha coperto correttamente il pozzetto	Aggiungere una quantità adeguata di materiale
	Reazione crociata tra i pozzetti	Evitare che nella prima incubazione si mescolino i contenuti di più pozzetti
	Pellicola sul vetrino dovuta all'uso di una matita cerata	Utilizzare una matita Controllare l'impostazione del microscopio
	Microscopio impostato non correttamente	Controllare la validità della lampada UV
Aspetto diffuso	Vetrino incubato in frigorifero senza coperchio	Sigillare il vetrino con smalto per unghie o paraffina
	icroscopio IF sporco. Eventualmente graffi sull'obiettivo	Pulire il microscopio attenendosi alle relative istruzioni
Fluorescenza debole o assente	Coniugato e vetrini scongelati e ricongelati	Conservare il coniugato e i vetrini a 2-8 °C / 35,6–46,4 °F.
	Controlli diluiti	Controllare le istruzioni, utilizzare i controlli del kit pronti per l'uso
	• Contaminazione batterica dei sieri o del coniugato • Microscopio non impostato correttamente • pH del tampone di lavaggio troppo basso (pH 7,4 ± 0,2)	Controllare questi aspetti
	Coniugato FITC esposto alla luce	Conservare il coniugato al riparo dalla luce
Fluorescenza di fondo	• Lavaggio non corretto • Vetrino asciugato • Sieri lipemici o emolitici • Errore del microscopio	• Controllare le istruzioni di lavaggio • Non lasciar asciugare i vetrini • Utilizzare solo sieri freschi • Controllare il filtro e l'obiettivo

14. SIMBOLI NORMATIVI

IVD	- Diagnosi in vitro	- For in vitro diagnostic use
	- Pour diagnostic in vitro	- Para uso diagnóstico in vitro
	- In-vitro-Diagnostikum	- In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	- Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	- Numero d'ordine	- Cataloge number
	- Référence Catalogue	- Numéro de catálogo
	- Katalognummer	- Αριθμός παραγγελίας
	- Número de catálogo	
LOT	- Descrizione lotto	- Lot
	- Lot	- Lote
	- Chargen Bezeichnung	- Χαρακτηρισμός παρτίδας
	- Lote	
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo	- Unique device identifier
	- Identifiant unique de l'appareil	- Identificador único del dispositivo
	- eindeutige Produktidentifizierung	- Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	- Identificador único do dispositivo	
CE	- Conformità europea	- EC Declaration of Conformity
	- Déclaration CE de Conformité	- Declaración CE de Conformidad
	- Europäische Konformität	- Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- Declaração CE de conformidade	
eIFU WWW.AESKU.COM	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso	- See electronical instructions for use
	- Voir les instructions d'utilisation électronique	- Siga las instrucciones electrónicas de uso
	- Elektronsiche Gebrauchsanweisung beachten	- Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Seguir as instruções electrónicas de utilização	
	- Da utilizzarsi entro	- Use by
	- Utilise avant le	- Utilizar antes de
	- Verwendbar bis	- Χρήση μέχρι
	- Utilizar antes de	
+2°C +8°C	- Conservare a 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conserver à 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Conservar a 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Lagerung bei 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Φυλάσσεται στους 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conservar entre 2-8°C (35.6-46.4°F)	
	- Prodotto da	- Manufactured by
	- Fabriqué par	- Fabricado por
	- Hergestellt von	- Κατασκευάζεται από
	- Fabricado por	
DYE	- Colorante Blue-Evans	- Evans-Blue Dye
	- coloration au Bleu Evans	- Colorante Azul de Evans
	- Evans-Blue Färbelösung	- Evans Blue
	- Evans Blue	
CONTROL +	- Controllo positivo	- Positive Control
	- Contrôle Positif	- Control Positivo
	- Positiv Kontrolle	- Θετικός ορός ελέγχου
	- Controlo positivo	
CONTROL −	- Controllo negativo	- Negative Control
	- Contrôle Négatif	- Control Negativo
	- Negativ Kontrolle	- Αρνητικός ορός ελέγχου
	- Controlo negativo	
SEAL	- Mezzi di montaggio	- Mounting media
	- milieu de montage	- Medio de montaje
	- Mounting Medium	- Μέσο μονιμοποίησης
	- Meio de montagem	
CONJ	- Coniugato	- Conjugate
	- Conjugé	- Conjugado
	- Konjugat	- Σύζευγμα
	- Conjugado	
	- Vetrino per microscopio	- Microscope slide
	- lame de microscope	- Portaobjetos
	- Objektträger	- Αντικειμενοφόρο πλακίδιο
	- Lâmina	
WASHB 10x	- Tampone di lavaggio	- Wash Buffer
	- Tampon de Lavage	- Solución de lavado
	- Waschpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	- Solucão de lavagem	
SB 1x	- Tampone di campione	- Sample Buffer
	- Tampon de Echantillons	- Solución de muestras
	- Probenpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	- Solução para amostras	

	- Numero di determinazioni	- Number of determnations
	- Nombre de déterminations	- Número de determinaciones
	- Anzahl der Prüfungen	- Αριθμός προσδιορισμών
	- Número de determinações	
	- Non riutilizzare	- Do not reuse
	- Ne pas réutiliser	- No reutilizar
	- Nicht wiederverwenden	- Μην επαναχρησιμοποιείτε
	- Não reutilizar	
	- Proteggere dall'esposizione alla luce	- Protect from exposure to light
	- Protéger de l'exposition à la lumière	- Proteger de la exposición a la luz
	- Vor Sonnenlicht schützen	- Προστασία από την έκθεση στο φως
	- Proteger da exposição à luz	
	- Conservare all'asciutto	- Store dry
	- Stocker au sec	- Almacenar en seco
	- Trocken aufbewahren	- Αποθηκεύστε ξηρά
	- Armazenar em local seco	
	- Non utilizzare se la confezione è danneggiata e consultare le istruzioni per l'uso	- Do not use if package is damaged and consult instructions for use
	- Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter le mode d'emploi.	- No utilizar si el envase está dañado y consultar las instrucciones de uso
	- Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist, und Gebrauchsanweisung beachten	- Μην χρησιμοποιείτε εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά και συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης.
	- Não utilizar se a embalagem estiver danificada e consultar as instruções de utilização	