



ImmuGlo™ ISLET CELL ANTIBODY (ICAb) TEST SYSTEM

IVD

PRODUCT INSERT

REF

Code 1123

40 Determinations

INTENDED USE

An indirect immunofluorescence test for the detection and semi-quantitation of islet cell antibodies in human serum to aid in the diagnosis of *insulin dependent diabetes mellitus* (IDDM).

SUMMARY AND EXPLANATION

Diabetes is a chronic and complex metabolic disease influenced by various hereditary and environmental factors that result in the inability of the body to maintain the use of carbohydrates, fats and proteins. The condition, characterized by high blood glucose levels, is caused by a deficiency in insulin production or an impairment of insulin utilization. Most cases of diabetes fall into two clinical categories: *insulin-dependent diabetes mellitus* (IDDM or Type I diabetes) and *non-insulin dependent diabetes mellitus* (NIDDM or Type II diabetes).

Prognosis, treatment and disease management are different for each type. It is well accepted that IDDM is an autoimmune disease targeting β -cells of the islets of Langerhans in the pancreas. The autoimmune response to islet cell antigens elicits antibody responses to antigens such as glutamic acid decarboxylase (GAD), ICA-512 and insulin. They have been found to be highly predictive markers, particularly if present in high titer¹⁻¹⁵. Detection of these ICAb's by indirect immunofluorescence (IF) on pancreas substrate is considered the gold standard for diagnosis of IDDM^{16,17}. These cytoplasmic ICAb's are currently used for the prediction of type I diabetes¹⁸⁻²⁰.

ICAb's are detected in up to 90% of newly diagnosed diabetic patients. In the Bart's-Windsor family study, 100% of the first degree relatives of IDDM patients with ICAb's >80 JDF units progressed to IDDM within 10 years. The level of ICAb's appears to be highest prior to the onset of Type I diabetes and diminishes progressively thereafter^{12,18}. ICAb's have several distinct specificities and show two major patterns of reactivity⁴. The first pattern is restricted predominantly to the β -cells. The second stains all cells within the islet, and is the classical staining pattern for cytoplasmic ICAb's.

PRINCIPLES OF PROCEDURES

Islet cell antibodies are detected by indirect immunofluorescence (IF). In this method, patients' sera are incubated on sections of monkey pancreas to allow binding of antibodies to the tissue substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of these sections with fluorescein-labeled conjugates. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. *The presence of islet cell antibodies is demonstrated by an apple green fluorescence of the cytoplasm of the islets of Langerhans.* The titer (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) is then determined by testing serial dilutions of the positive control²¹.

PRODUCT INFORMATION

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. Reagents are ready for use after equilibration to room temperature.

Materials Provided

ImmuGlo™ anti-Islet Cell IFA **REF** 1123

Kits contain sufficient reagents to perform 40 determinations each.

10 x	SORB SLD	4 well Monkey Pancreas Substrate Slides
1 x 0.5 ml	CONTROL + ICA *	ICA Positive Control. Human serum containing islet cell antibodies, standardized against the JDF (Juvenile Diabetes Foundation) positive reference serum. JDF units are stated on the vial label.
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Anti-human FITC Conjugate. Protect from light.
1 x 5.0 ml	CONJ B *	Conjugate B. Protect from light.
1 x 60 ml	BUF *	Sample Diluent.
2 vials	BUF WASH	Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Mounting Medium. Do not freeze.
1 x 1.0 ml	EVANS	Evan's Blue Counterstain.
1 x 12	COVER SLD	Coverslips. Reconstitute to one liter each.

* Contains < 0.1% NaN₃

Materials Required But Not Provided

Fluorescence microscope
Micropipette or Pasteur pipette
Serological pipettes
Staining dish (e.g. Coplin jar)
Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack
Distilled or deionized water
1 liter container
Wash bottle
Paper towels
Incubation chamber

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HbsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials²².

WARNING - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from IMMCO. Do not use beyond expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Test Method

A. Screening

1. Dilute each patient serum 1:5 with the Sample Diluent provided (0.1 ml serum + 0.4 ml Diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for 10-15 minutes. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of Positive Control to well #2. Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 18 - 24 hours at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash 10 minutes. Repeat process with all remaining slides.
8. Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the IgG FITC Conjugate dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) to each well.
9. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.
10. Repeat steps **7 through 9** for each slide, using Conjugate B in place of IgG FITC Conjugate.
11. Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for 10 minutes. If desired, 2-3 drops of Evans blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **3 drops** of Mounting Medium evenly on the coverslip and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.
14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.

Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed for up to 48 hours. Slides should be stored in the dark at 2-8°C.

B. Endpoint Determination (titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following steps 5 through 13 to determine the titer. Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make serial two-fold dilutions starting at 1:5. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

If the Positive Control titer is within the limits defined by the enclosed QC specifications, the levels of the antibody in patient serum can then be reported in JDF units¹⁶. The JDF unit value of the Positive Control is printed on the vial label. To calculate the JDF unit value of the unknown serum, simply divide the titer of the unknown by the titer of the Positive Control and multiply this by the JDF units on the Positive Control label.

Example:

Positive Control titer is 1:4. Unknown Sample titer 1:10. Positive Control label reads 160 JDF units.

Calculation:

$$\text{ICAb Concentration : } \frac{10}{4} \times 160 = 400 \text{ JDF Units}$$

Preparation of Serial Dilutions

Number four tubes 1 through 4. Add 0.4 ml of Sample Diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 4. Pipette 0.1 ml of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 0.2 ml from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 0.2 ml from one tube to the next after mixing to yield the dilutions depicted in the following table:

Tubes	1	2	3	4
Serum	0.1 ml			
	+			
Buffered Diluent	0.4 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		⇄	⇄	⇄
Transfer		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Final dilution	1:5	1:10	1:20	1:40 etc.

QUALITY CONTROL

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run. The Negative Control should show no specific fluorescence of the of the islet cells, whereas the Positive Control should stain the cytoplasm of the islet cells.

If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control
- Problems with the optical system of the fluorescence microscope. These may include : improper alignment, bulb beyond useful life expectancy, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.

RESULTS

The results of the tests for islet cell antibodies should be reported as negative (<5) or positive with titer or JDF units⁸.

Read for specific staining of the cytoplasm of the islet of Langerhans. Various other tissue antibodies such as antinuclear antibodies (ANA), mitochondrial antibodies, and smooth muscle antibodies may also be observed on pancreas sections. Sera giving any of these reactions should be reported as negative for antibodies to islet cells. Any sera giving nuclear staining reactions may be tested on HEp-2 cells or mouse liver sections. Any sera giving smooth muscle or mitochondrial staining reactions may be tested on mouse kidney/stomach sections. See ICAb positive reaction in Photo 1 at the end of this document.

NOTE: ICAb reactions are, by their nature, much weaker than reactions for ANA or most other immunofluorescence antibody reactions.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Occasionally sera may exhibit strong staining for ANA or other autoantibodies. These may interfere with the ability to detect islet cell antibodies. In such cases, titrating the serum may permit the visualization of the islet cell antibodies. In other cases their titer may be lower than the ANA or other antibodies and hence may not be detected.

The ImmuGlo™ islet cell antibody test should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only.

EXPECTED VALUES

Approximately 50-80% of new-onset diabetics are positive for islet cell antibodies. The prevalence of islet cell antibodies in non-diabetic first-degree relatives and in non-diabetic normal subjects has been reported to be 2-5% and 0.25-1.7%, respectively⁵⁻¹⁶. Approximately 11% of islet cell antibody positive first-degree relatives develop diabetes each year. Intervals of as long as 8 years between detection of islet cell antibodies and the onset of diabetes have been reported. See ICAb incidence in Table 1 at the end of this document.



ImmuGlo™ Anti-Cellule Îlot (ICAb) Système

IVD

REF

1123

40 Déterminations

Test par immunofluorescence indirecte pour la recherche et la détermination semi-quantitative des anticorps des cellules des îlots de Langerhans (ICAb) dans le sérum humain pour le diagnostic du diabète insulino-dépendant (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM).

GENERALITES

Le diabète est une maladie métabolique chronique et complexe influencée par les divers facteurs héréditaires et environnementaux qui ont comme conséquence l'incapacité du corps de maintenir l'utilisation des hydrates de carbone, des graisses et des protéines. La condition, caractérisée par les niveaux élevés de glucose de sang, est provoquée par une insuffisance dans la production d'insuline ou un affaiblissement d'utilisation d'insuline. La plupart des cas de diabète entrent dans deux catégories cliniques : IDDM (diabète type 1) et NIDDM (diabète type II).

La gestion de pronostic, de traitement et de maladie sont différentes pour chaque type. On l'accepte bien qu'IDDM est une maladie auto-immune visant des β -cellules des îlots de Langerhans dans le pancréas. La réponse auto-immune aux antigènes des cellules des îlots obtient des réponses d'anticorps aux antigènes tels que le glutamic acid decarboxylase (GAD), l'ICA-512 et l'insuline. Ils se sont avérés les marqueurs fortement prédictifs, en particulier si actual dans le titre élevé ¹⁻¹⁵. La détection de ces ICAb par l'immunofluorescence indirecte (IF) sur le substrat de pancréas est considérée le étalon or or pour le diagnostic d'IDDM ^{16,17}. Ces ICAb cytoplasmiques sont actuellement employés pour la prévision du diabète type I ¹⁸⁻²⁰.

ICAb sont détectés dans jusqu'à 90% de patients diabétiques nouvellement diagnostiqués. Dans l'étude de famille de Bart, 100% des premiers parents de degré des patients d'IDDM avec ICAb > 80 unités de JDF a progressé à IDDM dans un délai de 10 ans. Le niveau d'ICAb semble être le plus élevé avant le début du type diabète d'I et diminue progressivement ensuite ^{12,18}. ICAb ont plusieurs spécificités distinctes et montrent deux modèles principaux de réactivité⁴. Le premier modèle est limité principalement aux β cellules. Le deuxième souille toutes les cellules dans l'îlot, et est le modèle de souillure classique pour ICAb cytoplasmique.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce coffret, le sérum du patient est incubé sur des sections de pancréas de primate, ce qui permet la fixation des autoanticorps avec le substrat. Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps fixés de classe IgG. Les réactivités sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert-pomme du cytoplasme des îlots de Langerhans montre la présence d'ICAb. Le titre du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé par dilutions sériques successives ¹⁴.

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs entre 2°et 8°C. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Avant utilisation, attendre que les réactifs s'équilibrent à la température ambiante du laboratoire.

Matériel fourni

ImmuGlo™ ICAb IFA **REF** 1123

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 40 déterminations chacune.

10x **SORB** **SLD** **4**
1 x 0,5 ml **CONTROL** **+** **ICA** *

1 x 0,5 ml **CONTROL** **-** *

1 x 5 ml **IgG-CONJ** **FITC** *

1 x 5.0 ml **CONJ** **B** *

1 x 60 ml **BUF** *

2 vials **BUF** **WASH**

1 x 5,0 ml **MOUNTING** **MEDIUM** *

1 x 1,0 ml **EVANS**

1 x 12 **COVER** **SLD**

* Contient < 0.1% NaN₃

Lames 4 puits de ICAb

Contrôle positif ICAb, sérum humain. Contient ICAb, normalisé dans des unités de JDF.

Contrôle négatif, sérum humain

Conjugué FITC anti-IgG. Maintenir à l'abri de la lumière

Conjugué B. Maintenir à l'abri de la lumière

Diluant sérum, avec de la BSA

Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre

Milieu de montage. Ne pas congeler

Contre colorant Bleu d'Evans

Lamelles couvre-lames

Matériel nécessaire mais non fourni

Microscope à fluorescence
Micropipette ou pipette Pasteur
Pipette sérologique
Bac à coloration pour le lavage des lames
Petits tubes (ex 13X75 mm) et portoir
Eau distillée ou déionisée
Epruvette graduée 1l
Flacon pour solution de lavage
Serviettes en papier
Chambre d'incubation

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic in vitro. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et trouvé non réactif en antigène de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés

contre le virus de l'hépatite C (anti HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti VIH1, anti VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage¹⁴.

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium. Ce composé peut former avec des canalisations de plomb ou de cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, lors de l'élimination de ces réactifs dans un évier, rincer l'évier à grande eau.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du coffret composants par d'autres provenant d'autres fabricants.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Seuls les sérums peuvent être utilisés dans ce test. Il est recommandé de ne pas les utiliser les sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne pouvant provoquer des interférences avec les performances du test. Conserver les sérums à 2-8°C pendant une semaine au maximum. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

MODE OPÉRATOIRE

A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:5 dans le diluant échantillon fourni (0.1ml de sérum + 0.4 ml de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des autoanticorps dans le cas où le dépistage sera trouvé positif.
2. Laisser revenir les lames à la température du laboratoire pendant 10-15 minutes dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat.
3. Numéroter les lames et les placer en chambre humide avec des serviettes papier mouillées pour éviter l'assèchement.
4. Appuyer doucement sur le flacon pour déposer 1 goutte (environ 50µl) de Contrôle Négatif sur le puits #1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif sur le puits #2. Eviter de déborder des puits.
5. Avec une micropipette ou une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder les puits.
6. Recouvrir la chambre humide et incuber les lames 18 - 24 heures à température ambiante.
7. Sortir une lame de la chambre humide. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette et environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un bécher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
8. Retirer une lame du bac. Éliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Déposer la lame dans la chambre humide. Déposer immédiatement 1 goutte de conjugué FITC dans chaque puits. Répéter les étapes 7 et 8 avec chaque lame.
9. Recouvrir la chambre humide et incuber 30 minutes à température ambiante.
10. Répétez les étapes 7 - 9 avec le conjugué B au lieu du conjugué FITC.
11. Sortir une lame de la chambre humide. Plonger la lame dans un bécher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Si une contre-coloration est souhaitée, ajouter 2-3 gouttes de Bleu d'Evans dans le dernier bain de lavage. Répéter les opérations avec toutes les lames.
REM: Un lavage incorrect peut causer la fluorescence de fond élevé.
12. Retirer une lame du bac. Éliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est humide.

13. Déposer doucement 3 gouttes de milieu de montage dans la lamelle couvre-lame également et appliquer la lamelle couvre-lame. Ne pas appliquer de pression excessive et éviter les mouvements latéraux de la lamelle.
14. Répéter les étapes 12 et 13 avec chaque lame.
15. Observer la fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope au grossissement X200 ou plus.

Les lames peuvent être lues immédiatement. Cependant, grâce à la présence d'un agent anti-fading dans le milieu de montage, la lecture peut être retardée jusqu'à 48 heures sans perte significative de l'intensité de fluorescence. Dans ce cas les lames doivent être conservées à l'obscurité à 2-8°C.

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les étapes 5 à 13 afin de définir son titre. Inclure dans chaque nouvelle série un contrôle positif et négatif. Les dilutions en série de 2 en 2 sont réalisées à partir du 1:5. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

Si le titre contrôle positif est dans les limites définies par les caractéristiques incluses de QC, les niveaux du sérum d'anticorps peuvent alors être rapportés dans les unités de JDF¹⁶. La valeur des unités JDF du contrôle positif est imprimée sur l'étiquette de fiole. Pour calculer la valeur d'unité de JDF du sérum inconnu, diviser simplement le titre de l'inconnu par le titre du contrôle positif et pour multiplier ceci par les unités JDF sur l'étiquette du contrôle positif.

Exemple:




Contrôle positif titre: 1:4, échantillon titre 1:10, l'étiquette Positive Control: 160 JDF units.

Calculation:

$$\text{Concentration ICAb: } \frac{10}{4} \times 160 = 400 \text{ Unités JDF}$$

Préparation des dilutions en série.

Numéroter quatre tubes de 1 à 4. Ajouter 0,4ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0,2 ml dans les tubes 2 à 4. Pipetter 0,1ml de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0,2 ml du tube 1 dans le tube suivant et après agitation répéter la même opération pour les tubes suivants comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

Tubes	1	2	3	4
Sérum	0,1 ml			
	+			
Diluant				
Echantillon	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
				
Transfert		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilution finale	1:5	1:10	1:20	1:40 etc.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne donne pas d'image fluorescente sur les cellules flocs, tandis qu'avec le contrôle positif on obtient une fluorescence de ces structures.

Dans le cas où les contrôles ne donnent pas les résultats attendus, il est recommandé de refaire le test. Si le problème persiste, cela peut être lié à:

- La turbidité. Eliminer le contrôle et en utiliser un nouveau.
- Au système optique du microscope. Par exemple: mauvais alignement, lampe ayant dépassé sa durée de vie, etc.
- A un assèchement des lames pendant la manipulation.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des essais pour des anticorps de cellules d'îlot devraient être rapportés en tant que négatif (< 5) ou positif avec titre ou unités de JDF⁸.

Lu pour la souillure spécifique du cytoplasme des cellules îlots de Langerhans. On peut également observer de divers autres anticorps de tissu tels que les anticorps antinucléaires (ANA), les anticorps mitochondriques, et les anticorps de muscle lisse sur des sections de pancréas. Des sérums donnant n'importe laquelle de ces réactions devraient être rapportés en tant que négatif pour des anticorps aux cellules îlots. Tous les sérums donnant des réactions de souillure nucléaires peuvent être examinés sur les cellules HEP-2 ou les sections de foie de souris. Tous les sérums donnant le muscle lisse ou les réactions de souillure mitochondriques peuvent être examinés sur des sections de la souris rein/ estomac. Voir la réaction positive d'ICAb en photo 1 à la fin de ce document. NOTE : Les réactions d'ICAb sont, par leur nature, beaucoup plus faible que des réactions pour ANA ou la plupart des autres réactions d'anticorps d'immunofluorescence.

LIMITES D'UTILISATION

De temps en temps les sérums peuvent montrer la souillure forte pour ANA ou d'autres autoanticorps. Ceux-ci peuvent interférer la capacité de détecter des anticorps de cellules d'îlot. Dans ces cas-ci, la titration du sérum peut permettre la visualisation des anticorps de cellules îlots. Dans d'autres cas leur titre peut être inférieur qu'ANA ou d'autres anticorps et par conséquent ne peut être détectée.

L'essai d'anticorps de cellules îlots ne devrait pas être réalisé dessus les échantillons hémolysés excessivement, par microbes souillés ou lipémiques. Cette méthode devrait être employée pour examiner les échantillons humains de sérum seulement.

VALEURS ATTENDUES

Approximativement 50-80% de diabétiques de nouveau-début sont positif pour des anticorps de cellules îlots. On a rapporté que la prédominance des ICAb dans les parents non-diabétiques de premier-degré et dans les sujets normaux non-diabétiques est 2-5% et 0.25-1.7%, respectivement⁵⁻¹⁶. Approximativement 11% de parents positifs de premier-degré d'anticorps de cellules d'îlot développent le diabète tous les ans. Des intervalles aussi de longtemps que 8 ans entre la détection des anticorps de cellules d'îlot et le début du diabète ont été rapportés. Voir l'incidence d'ICAb dans le tableau 1 à la fin de ce document.



Immuglo™ Anti-Célula Islote (ICAb) Test

IVD

IMMCO
DIAGNOSTICS

REF

1123

40 Determinations

Test de detección de inmunofluorescencia indirecta para la detección y semicuantificación de los anticuerpos por las células de los islotes de Langerhans (ICAb) en el suero humano, para la diagnosis de la diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica y compleja influenciada por los varios factores hereditarios y ambientales que dan lugar a la inhabilidad del cuerpo de mantener el uso de carbohidratos, de grasas y de proteínas. La condición, caracterizada por los altos niveles de la glucosa de la sangre, es causada por una deficiencia en la producción de la insulina o una debilitación de la utilización de la insulina. La mayoría de los casos de la diabetes bajan en dos categorías clínicas: IDDM (diabete tipo I) y NIDDM (diabete tipo II).

La gerencia del pronóstico, del tratamiento y de la enfermedad es diferente para cada tipo. Se acepta bien que IDDM es una enfermedad autoinmune que apunta β células de los islotes de Langerhans en el páncreas. La respuesta autoinmune a los antígenos células islotes saca respuestas del anticuerpo a los antígenos tales como glutamic acid decarboxylase (GAD), ICA-512 e insulina. Se han encontrado para ser marcadores altamente proféticos, particularmente si es presente en el alto título¹⁻¹⁵. La detección de estos ICAb por inmunofluorescencia indirecta (IF) en el suero del páncreas se considera el patrón oro para la diagnosis de IDDM^{16,17}. Estos ICAb citoplásmicos se utilizan actualmente para la predicción del diabete tipo I¹⁸⁻²⁰.

ICAb se detectan en el hasta 90% de pacientes diabéticos nuevamente diagnosticados. En el estudio de la familia de Bart's-Windsor, 100% de los primeros parientes del grado de los pacientes de IDDM con ICAb > 80 unidades de JDF progresó a IDDM en el plazo de 10 años. El nivel de ICAb aparece ser el más alto antes del inicio del tipo diabete de I y disminuye progresivamente después de eso^{12,18}. ICAb tienen varias especificidades distintas y demuestran dos patrones importantes de la reactividad⁴. El primer patrón se restringe predominante a los β células. El segundo mancha todas las células dentro del islote, y es el patrón que se mancha clásico para ICAb citoplásmico.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Para la realización del método de inmunofluorescencia indirecta de este equipo tiene que incubarse el suero de los pacientes en secciones del primate páncreas y, de este modo, permitir que los anticuerpos puedan unirse al sustrato. Cualquier anticuerpo no unido se elimina mediante lavado del portaobjetos. Los anticuerpos unidos de la clase IgG se detectan mediante incubación del sustrato con un conjugado marcado con fluoresceína. Las reacciones se visualizan en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. La presencia de ICAb se demuestra mediante la presencia de fluorescencia de color verde en las células de los islotes de Langerhans. Posteriormente se determina el título (valor recíproco de la mayor dilución que origina una reacción positiva) mediante diluciones seriadas¹⁴.

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

Almacenamiento y preparación

Almacenar todos los reactivos a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos pueden emplearse después de haber sido equilibrados a temperatura ambiente.

Materiales Suministrados

ImmuGlo™ ICAb IFA **REF** 1123

El kit contiene los suficientes reactivos para realizar 40 determinaciones.

10x **SORB** **SLD** **4**

Portaobjetos de 4 pocillos con sustrato del primate pancreas.

1 x 0,5 ml **CONTROL** **+** **ICA**

Control positivo de ICAb, suero humano. Contiene ICAb, estandarizado en unidades de JDF.

1 x 0,5 ml **CONTROL** **-** *

Control negativo, suero humano

1 x 5 ml **IgG-CONJ** **FITC** *

Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)-IgG con BSA. Proteger de la luz

1 x 5 ml **CONJ** **B** *

Conjugado B con BSA. Proteger de la luz

1 x 60 ml **BUF** *

Diluyente de la muestra con BSA

2 viales **BUF** **WASH**

Fosfato salino tamponado (PBS). Disolver cada vial en 1 litro

1 x 5,0 ml **MOUNTING** **MEDIUM** *

Medio de preparación. No congelar

1 x 1,0 ml **EVANS**

Colorante de contraste azul de Evans

1 x 12 **COVER** **SLD**

Cubreobjetos

* PRECAUCIÓN - Contiene < 0.1% NaN₃

Material necesario, pero no suministrado

Microscopio de fluorescencia

Micropipetas o pipeta Pasteur

Pipetas serológicas

Placa de tinción (por ejemplo, frasco de Coplin)

Tubos de ensayo pequeños (por ejemplo, 13 x 75 mm) y gradilla de tubos de ensayo

Agua destilada o desionizada

Envase de 1 litro

Frasco de lavado

Toallas de papel

Cámara de incubación

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*. Todos los componentes de derivados sanguíneos humanos han sido ensayados respecto a la presencia de HbsAg, VHC, VIH-1 y 2 y el virus linfotropo de células T humanas (VLTH-I), siendo negativos en los ensayos necesarios según la FDA

(Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos). Todas las muestras de suero y los derivados sanguíneos humanos deben tratarse como un material potencialmente peligroso, independientemente de su origen. En consecuencia, deben seguirse unas prácticas de laboratorio adecuadas durante el almacenamiento, dispensación y eliminación de dicho material ¹⁴.

PRECAUCIÓN - La azida sódica (NaN_3) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas muy explosivas. Después y desechar los líquidos, es necesario lavar con un volumen grande de agua para evitar la acumulación de azida. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere. En caso de ingestión, notificarlo inmediatamente al director del laboratorio o al centro toxicológico.

Para poder garantizar la obtención de resultados válidos, deben seguirse de forma exacta las instrucciones indicadas en este prospecto. No intercambiar componentes del equipo por otros diferentes que no tengan el mismo número de catálogo de IMMCO. No utilizar este equipo después de la fecha de caducidad.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para la realización de esta determinación sólo debe utilizarse suero. Las muestras con hemólisis macroscópica, lipémicas o contaminadas por microorganismos pueden interferir en el funcionamiento del ensayo y, por tanto, no deben ser utilizadas. Almacenar las muestras a una temperatura de 2-8°C durante un período no superior a una semana. Cuando se desee un almacenamiento más prolongado, el suero debe congelarse a una temperatura de -20°C. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

PROCEDIMIENTO

Método de ensayo

A. Detección sistemática

1. Diluir 1:5 el suero de cada paciente con el diluyente de la muestra suministrado (0,1 ml de suero + 0,4 ml del diluyente). No diluir los Controles Positivo o Negativo. Guardar el suero no diluido para la determinación del título de anticuerpos si los resultados son positivos.
2. Permitir que los pocillos de los portaobjetos que contienen el sustrato se equilibren a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraer con cuidado los portaobjetos sin tocar el sustrato.
3. Etiquetar los portaobjetos y colocarlos en una cámara de incubación cubierta con toallas de papel humedecidas con agua para evitar la desecación.
4. Invertir el vial cuentagotas y presionar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 μl) del Control Negativo en el pocillo nº 1. De forma similar, aplicar una gota del Control Positivo en el pocillo nº 2. Evitar llenar demasiado los pocillos.
5. Con el empleo de una micropipeta o una pipeta Pasteur, colocar 1 gota del suero diluido del paciente (aproximadamente 50 μl) en los restantes pocillos. Evitar llenar demasiado los pocillos.
6. Tapar la cámara de incubación e incubar los portaobjetos durante 18 - 24 horas a temperatura ambiente.
7. Quitar la tapa de la cámara de incubación. Coger el portaobjetos por el extremo y lavar suavemente con 10 ml de PBS mediante el empleo de una pipeta o lavar el portaobjetos en un vaso de precipitado lleno de PBS. No emplear un frasco de lavado. Transferir inmediatamente el portaobjetos al frasco de Coplin y dejarlo durante 10 minutos. Repetir el proceso con todos los portaobjetos restantes.
8. Extraer el portaobjetos del frasco de Coplin. Secar el extremo del portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Colocar el portaobjetos en la cámara de incubación, Invertir inmediatamente el vial cuentagotas del Conjugado FITC y apretar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 μl) en cada pocillo. Repetir las etapas 7 y 8 con cada portaobjetos.
9. Tapar la cámara de incubación. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

10. Repetir las etapas 7 - 9 con Conjugado B en lugar de Conjugado FITC.
11. Extraer el portaobjetos del incubador. Sumergir el portaobjetos en un vaso de precipitado con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Colocar el portaobjetos en una cubeta de tinción llena con PBS durante 10 minutos. Al final del lavado puede añadirse, si se desea, 2-3 gotas de colorante de contraste azul de Evans. Repetir el proceso con los portaobjetos restantes. NOTA: un lavado inadecuado puede aumentar fluorescencia del fondo.
12. Extraer el portaobjetos de la cubeta de tinción. Secar el portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Para evitar que se seque el portaobjetos, realizar inmediatamente, mientras el portaobjetos todavía está húmedo, el proceso descrito en el apartado 13.
13. Añadir 3 gota del Medio de Preparación uniformemente en cubreobjetos y colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos. Evitar la aplicación de una presión excesiva y el movimiento lateral del cubreobjetos.
14. Repetir las etapas 12 y 13 con cada portaobjetos.
15. Examinar el desarrollo de fluorescencia específica en un microscopio de fluorescencia a 200x o más aumentos.

Los portaobjetos pueden leerse al terminar su preparación. Sin embargo, debido a que el medio de preparación contiene un agente antidestefimiento, puede retrasarse la lectura durante un período de hasta 48 horas sin que se produzca una pérdida significativa de la intensidad de la tinción. Los portaobjetos deben almacenarse en la oscuridad a una temperatura de 2-8°C.

B. Determinación del punto de valoración (titulación)

Los sueros positivos durante el ensayo pueden valorarse de forma adicional, etapas 5- 13, para determinar su titulación. Cada ensayo debe incluir un control positivo y negativo. Realizar diluciones seriadas dobles a partir de 1:5. El título es el valor recíproco de la dilución más elevada que produzca una reacción positiva.

Si el título del control positivo está dentro de los límites definidos por las especificaciones incluidas de QC, los niveles del anticuerpo en suero paciente se pueden entonces divulgar en las unidades de JDF¹⁶. El valor de unidad JDF del control positivo se imprime en la etiqueta del frasco. Para calcular el valor de unidad de JDF del suero desconocido, dividir simplemente el título del desconocido por el título del control positivo y para multiplicar esto por las unidades JDF en la etiqueta del control positivo.

Ejemplo:

Control Positivo titer: 1:4. Muestra titer 1:10. Etiqueta control positivo: 160 unidades JDF.

Calculación:

$$\text{Concentración ICAB: } \frac{10}{4} \times 160 = 400 \text{ JDF Units}$$

Preparación de las diluciones seriadas

Numerar cuatro tubos del 1 al 4. Añadir 0,4 ml del diluyente de la muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 4. Pipetear 0,1 ml del suero no diluido en el tubo 1 y mezclar minuciosamente. Transferir 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezclar meticulosamente. Continuar transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente tras la mezcla y, de este modo, conseguir las diluciones ilustradas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4
Suero	0,1 ml			
	+			
Diluyente tamponado	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Transferencia		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilución final	1:5	1:10	1:20	1:40etc.

CONTROL DE CALIDAD

En cada serie de ensayos debe incluirse un control positivo y negativo. El control negativo no debe mostrar fluorescencia específica de la garnición endomiso del músculo liso se lía; por el contrario, el control positivo debe tener una intensidad de tinción igual o superior a 2+ del tubos de estas estructuras.

Cuando no se obtienen los resultados esperados, debe repetirse el ensayo. Los resultados anómalos con los controles pueden producirse por:

- Turbidez. Desechar y utilizar otro control.
- Problemas del sistema óptico del microscopio de fluorescencia. Estos problemas pueden incluir un alineamiento inadecuado, una lámpara con fecha posterior a la esperanza de vida útil, etc.
- Secado del portaobjetos durante el procedimiento.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de las pruebas para los anticuerpos de la célula islota se deben divulgar como negativa (< 5) o positivo con el título o las unidades de JDF⁸.

Leído para mancharse específico del citoplasma de las células islotas de Langerhans. Los anticuerpos otros del tejido fino tales como anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos mitochondrial, y anticuerpos lisos del músculo se pueden también observar en secciones del páncreas. Los sueros que dan cualesquiera de estas reacciones se deben divulgar como negativa para los anticuerpos a las células islotas. Cualquier suero que da reacciones que se manchan nucleares se puede probar en las células HEp-2 o las secciones del hígado del ratón. Cualquier suero que da el músculo liso o reacciones que se manchan mitochondrial se puede probar en secciones del ratón rim/estómago. Ver la reacción positiva de ICAb en la foto 1 en el extremo de este documento.

NOTA: Las reacciones de ICAb están, al lado de su naturaleza, mucho más débil que las reacciones para ANA o la mayoría de las otras reacciones del anticuerpo de la inmunofluorescencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los sueros pueden exhibir de vez en cuando mancharse fuerte para ANA u otros autoanticuerpos. Éstos pueden interferir con la capacidad de detectar los anticuerpos de la célula islota. En tales casos, la titulación del suero puede permitir la visualización de los anticuerpos de la célula islota. En otros casos su título puede ser más bajo que el ANA u otros anticuerpos y por lo tanto puede no ser detectado.

La prueba del anticuerpo de la célula del islote no se debe realizar encendido hemolizadas grueso, microbiano contaminadas o lipémicas las muestras. Este método se debe utilizar para probar muestras humanas del suero solamente.

VALORES ESPERADOS

Aproximadamente 50-80% de diabéticos del nuevo-inicio es positivo para los anticuerpos de la célula del islote. El predominio de los anticuerpos de la célula del islote en parientes no-diabéticos del primero-grado y en temas normales no-diabéticos se ha divulgado para ser 2-5% y 0.25-1.7%, respectivamente ⁵⁻¹⁶. Los aproximadamente 11% de parientes positivos del primero-grado del anticuerpo de la célula islota desarrollan la diabetes cada año. Los intervalos mientras 8 años entre la detección de los anticuerpos de la célula del islote y el inicio de la diabetes se han divulgado. Ver la incidencia de ICAb en la tabla 1 en el extremo de este documento.



ImmuGlo™ Anti-Insulzellen Antikörper (ICAb) System

IVD

REF

1123

40 Determinations

Für den Nachweis und die semiquantitative Bestimmung von der langerhans'schen Inselzellen Antikörper (ICAb) mit der indirekten Immunfluoreszenz. ICAb dient der Diagnose von bestimmten der insulinabhängigen Diabetes Mellitus (IDDM).

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Diabetes ist eine chronische und komplizierte metabolische Krankheit, die durch verschiedene erbliche und Klimafaktoren beeinflusst wird, die die Unfähigkeit des Körpers, den Gebrauch der Kohlenhydrate, der Fette und der Proteine beizubehalten ergeben. Die Bedingung, gekennzeichnet durch hohe Blutglukoseniveaus, wird durch einen Mangel in der Insulinproduktion oder eine Beeinträchtigung der Insulinanwendung verursacht. Die meisten Fälle vom Diabetes fallen in zwei klinische Kategorien: IDDM (Typ-I Diabetes) und NIDDM (Typ-II Diabetes).

Prognose-, Behandlungs- und Krankheitsmanagement sind für jede Art unterschiedlich. Es wird gut angenommen, daß IDDM ein Autoimmunkrankheit ist, das b-zellen von der langerhans'schen Inselzellen im Pankreas zielt. Die autoimmune Antwort zu den Inselzellenantikörpern bekommt Antikörperantworten zu den Antigenen wie glutamic acid decarboxylase (GAD), ICA-512 und Insulin heraus. Sie sind gefunden worden, um in hohem Grade vorbestimmte Markierungen zu sein, besonders wenn anwesend in hohem Titer¹⁻¹⁵. Abfragung dieser ICAb durch indirekte Immunfluoreszenz (IF) auf Pankreassubstrat gilt als die Goldaktie für Diagnose von IDDM^{16,17}. Diese zellplasmatischen ICAb werden für die Vorhersage der Typ-I Diabetes verwendet¹⁸⁻²⁰.

ICAb werden in bis 90% von eben bestimmten zuckerkranken Patienten ermittelt. In der Bart's-Windsor Familie Studie 100% der ersten Gradverwandten der IDDM Patienten mit kam ICAb > 80 JDF Maßeinheiten bis zu IDDM innerhalb 10 Jahre weiter. Das Niveau von ICAb scheint, vor dem Angriff der Typ-I Diabetes am höchsten zu sein und vermindert nach und nach danach^{12,18}. ICAb haben einige eindeutige Besonderheiten und zeigen zwei Hauptmuster Reaktivität⁴. Das erste Muster wird überwiegend auf die b-zellen eingeschränkt. Das zweite befleckt alle Zellen innerhalb der kleinen Insel und ist das klassische befleckende Muster für zellplasmatisches ICAb.

TESTPRINZIP

Bei dem in diesem Test eingesetzten indirekten Immunfluoreszenzverfahren werden Patientenseren mit Primatpankreas inkubiert, um die Bindung von in den Seren vorhandenen Autoantikörpern an die Substrat zu ermöglichen. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Gebundene Antikörper vom Typ IgG werden durch Inkubation der Substrat mit Fluorescein-markiertem nachgewiesen. Das Reaktionsmuster wird unter einem Fluoreszenzmikroskop bewertet, das mit den entsprechenden Filtern ausgerüstet ist. Das Vorhandensein von ICAb zeigt sich durch eine apfelgrüne vom Langerhans Inselzellen Fluoreszenz. Anschließend kann der Titer (der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, die eine positive.

PRODUKTINFORMATION

Lagerung und Handhabung

Alle Reagenzien sind bei 2-8°C zu lagern. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, nachdem sie auf Raumtemperatur gebracht wurden.

In der Testpackung vorhandenes Material

ImmuGlo™ ICAb IFA **REF** 1123

Installationssätze enthalten genügende Reagenzien, um 40 Ermittlungen jede durchzuführen.

10x	SORB SLD 4	Objektträger zu 4 Auftragstellen beschichtet mit ICAb.
1 x 0.5 ml	CONTROL + ICA *	ICAb Positive Kontrolle , Humanserum mit BSA. Enthält ICAb, standardisiert in den JDF Maßeinheiten.
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Negative Kontrolle , Humanserum mit BSA
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	FITC-Konjugat IgG mit BSA. Lichtgeschützt aufbewahren
1 x 5 ml	CONJ B *	Konjugat B mit BSA. Lichtgeschützt aufbewahren
1 x 60 ml	BUF *	Probendiluent mit BSA
2 vials	BUF WASH	Phosphatgepuffertes Kochsalz (PBS) . Inhalt eines Fläschchens in 1 Liter auflösen
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Eindeckmittel . Nicht einfrieren
1 x 1.0 ml	EVANS	Evans Blau Färbemittel
1 x 12	COVER SLD	Deckgläschen

* enthält < 0.1% NaN₃

Zusätzlich benötigtes Material

Fluoreszenzmikroskop
Mikropipetten oder Pasteurpipetten
Kolbenhubpipette
Färbetrog (z.B. nach Coplin)
Kleine Reagenzröhrchen (z.B. 12x75 mm) und dazu passende Gestelle
Destilliertes oder entionisiertes Wasser
Behälter, 1 Liter
Papierhandtücher
Feuchte Kammer

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für In-vitro-Diagnostik. Alle Bestandteile menschlichen Ursprungs wurden auf das Vorhandensein von HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV-1/HIV-2 und Anti-HTLV-1 mit FDA-

zugelassenen Tests untersucht und für negativ befunden. Alle Humanseren und Produkte menschlichen Ursprungs sollten ungeachtet ihrer Herkunft als potentiell gefährlich gehandhabt werden. Diese Materialien und ihre Behältnisse sind nach geltenden Vorschriften und Richtlinien zu lagern und zu beseitigen ¹⁴.

ACHTUNG - Natriumazid (NaN_3) kann mit Kupfer und Blei in Leitungen und Lötstellen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren. Um eine Bildung solcher Metallazide zu vermeiden, müssen Ausgüsse nach dem Ausgießen azidhaltiger Lösungen mit reichlich Wasser gespült werden. Natriumazid kann beim Verschlucken giftig sein. Fälle von Verschlucken sofort dem Laborleiter oder der Giftzentrale melden.

Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, ist das Testprotokoll unbedingt einzuhalten. Falls Kitreagenzien ersetzt werden müssen, sollten nur Artikel von IMMCO der gleichen Artikelnummer verwendet werden. Keine verfallenen Reagenzien verwenden.

PROBENGWINNUNG UND HANDHABUNG

Bei diesem Verfahren sollte nur Serum verwendet werden. Deutlich hämolytische, lipämische oder mikrobiell kontaminierte Proben können die Leistung dieses Tests beeinträchtigen und sollten daher nicht verwendet werden. Proben sollten nicht länger als eine Woche bei 2-8 °C gelagert werden. Bei längerer Lagerung sollten sie bei -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Testmethode

A. Screening

1. Jedes Patientenserum mit dem Probendiluent aus dem Kit 1:5 (0.1ml Serum + 0.4 ml Diluent) verdünnen. Die positiven und negativen Kontrollen nicht verdünnen. Die unverdünnnten Nativseren aufbewahren, um bei positivem Suchtestergebnis gegebenenfalls den Antikörpertiter bestimmen zu können.
2. Beutel mit den beschichteten Objektträgern auf Raumtemperatur bringen (10-15 Minuten). Objektträger vorsichtig entnehmen, ohne die Beschichtung zu berühren.
3. Objektträger beschriften und, um ein Austrocknen der Beschichtung zu verhindern, in eine feuchte Kammer legen.
4. Von den Tropffläschchen mit der Negativen und Positiven Kontrolle jeweils 1 Tropfen (etwa 50 µl) auf die Auftragstellen #1 bzw. #2 ausdrücken. Auftragstellen nicht überfüllen.
5. Mit einer Mikro- oder Pasteurpipette 1 Tropfen verdünntes Patientenserum (etwa 50 µl) auf die weiteren Auftragstellen geben. Auftragstellen nicht überfüllen.
6. Die Objektträger in der abgedeckten feuchten Kammer 18-24 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Jeweils einen Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und sorgfältig mit ca. 10 ml PBS aus einer Pipette spülen; alternativ Objektträger in einem Becher mit PBS spülen. Keine Spritzflasche verwenden. Objektträger sofort in einen Färbetrog mit PBS für 10 Minuten stellen. Mit den anderen Objektträgern ebenso verfahren.
8. Objektträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objektträgers gegen ein Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Objektträger in die feuchte Kammer legen und sofort vom Tropffläschchen mit FITC Konjugat 1 Tropfen (ca. 50 µl) auf jede Auftragstelle ausdrücken. Die Schritte 7 und 8 mit jedem Objektträger einzeln durchführen.
9. Feuchte Kammer abdecken und Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
10. Die Schritte 7 - 9 mit Konjugat B anstelle von FITC Konjugat wiederholen.
11. Jeweils einen Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und in einen Becher mit PBS eintauchen, um Überschuß an Konjugat zu entfernen. Objektträger 10 Minuten in einen Färbetrog mit PBS stellen. Falls Gegenfärbung

gewünscht ist, können 2-3 Tropfen Evans Blau Färbemittel pro Trog hinzugefügt werden. Mit den anderen Objektträgern ebenso verfahren. HINWEIS: Unsachgemäßes Waschen kann Hintergrundfluoreszenz erhöhen.

12. Objektträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objektträgers gegen ein Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Um ein Austrocknen der Beschichtung zu vermeiden, sofort mit Schritt 13 fortfahren.
13. 3 Tropfen des Eindeckmittels sorgfältig auf Deckgläschen gleichmäßig geben und ein Deckgläschen auflegen. **Leicht** andrücken **und seitliche** Bewegung des Deckgläschens vermeiden.
14. Die Schritte 12 und 13 mit jedem Objektträger einzeln durchführen.
15. Auf spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200facher Vergrößerung auswerten.

Die Objektträger können sofort nachdem sie angefertigt wurden ausgewertet werden. Weil das Eindeckmittel einen Stoff enthält, der einem Ausbleichen entgegenwirkt, können die Objektträger jedoch bis 48 Std. später ausgewertet werden, ohne daß die Intensität der Fluoreszenz signifikant abklingt. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8°C gelagert werden.

B. Titerbestimmung

Bei einem im Suchtest positiven Serum kann nach Durchführung der **Schritte** 5 bis 13 der Titer bestimmt werden. Zu diesem Zweck ist ausgehend von einer 1:5-Verdünnung eine Reihenverdünnung zu erstellen.

Bei jedem Testlauf sollten die positive und negative Kontrolle mitgeführt werden. Der Titer ergibt sich aus dem reziproken Wert der höchsten Verdünnung, die ein positives Ergebnis zeigt.

Wenn der positive Steuertiter innerhalb der Begrenzungen ist-, die durch die beiliegenden QC Spezifikationen definiert werden, können die Niveaus des Antikörperanstaltspatientenserums in JDF Maßeinheiten dann berichtet werden¹⁶. Der JDF Maßeinheit Wert der Positive Kontrolle wird auf dem Phioleaufkleber gedruckt. Den JDF Maßeinheit Wert des unbekanntes Serums errechnen, den Titer des Unbekannten durch den Titer der Positiven Kontrolle einfach teilen und dieses mit den JDF Maßeinheiten auf dem Positive Kontrolleaufkleber zu multiplizieren.

Beispiel:

Positive Kontrolle Titer: 1:4. Probe titer 1:10. Positive Kontrolleaufkleber: 160 JDF Maßeinheiten.

Rechnung:

$$\text{ICAb Konzentration: } \frac{10}{4} \times 160 = 400 \text{ JDF Maßeinheiten}$$

Herstellung einer Reihenverdünnung

Vier Röhrrchen mit 1 bis 4 beschriftet. Vom Probendiluent 0,4 ml in Röhrrchen 1 und jeweils 0,2 ml in Röhrrchen 2 bis 4 geben. 0,1 ml unverdünntes Serum in Röhrrchen 1 pipettieren und gründlich durchmischen. Aus Röhrrchen 1 0,2 ml ins Röhrrchen 2 überführen und gründlich durchmischen. Die Verdünnungsreihe wie in der folgenden Tabelle dargestellt fortführen, indem nach Durchmischen jeweils 0,2 ml von einem Röhrrchen in das nächste überführt werden.

Röhrchen	1	2	3	4
Serum	0,1 ml			
	+			
Probendiluent	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻
Zu überführen		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Endverdünnung	1:5	1:10	1:20	1:40 etc.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl eine positive wie eine negative Kontrolle mitgeführt werden. Die negative Kontrolle sollte keine spezifische Fluoreszenz der endomysium Futter der glatten Muskelbündel zeigen. Sollte die positive Kontrolle eine Fluoreszenzintensität von mindestens 2+ im Schläuche der Strukturen zeigen. Werden die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten, sollte der Testlauf wiederholt werden. Sind die Ergebnisse mit den Kontrollen auch dann nicht wie erwartet, kann dies folgende Ursachen haben:

- Trübungen. Kontrolle(n) verwerfen und eine neue verwenden.
- Probleme mit der Optik des Mikroskops, wie z.B.: unsachgemäße Ausrichtung, Lampe zu alt, usw.
- Objektträgerbeschichtung während Testdurchführung ausgetrocknet.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Resultate der Tests für Inselzelle Antikörper sollten als Negativ berichtet werden (< 5) oder Positiv mit Titer oder JDF Maßeinheiten ⁸.

Gelesen für das spezifische Beflecken des Zytoplasmas der langerhans'schen Inselzellen. Viele Gewebeantikörper wie Antinuklearantikörper (ANA), mitochondrische Antikörper und glatte Muskelantikörper können auf Pankreasabschnitten auch beobachtet werden. Die Seren, die irgendwelche dieser Reaktionen geben, sollten als Negativ für Antikörper Inselzellen berichtet werden. Alle mögliche Seren, die befleckende Kernreaktionen geben, können auf Zellen HEP-2 oder Mäuseleberabschnitten geprüft werden. Alle mögliche Seren, die glatten Muskel oder mitochondrische befleckende Reaktionen geben, können auf Abschnitten der Maus Niere/Magen geprüft werden. ICAb positive Reaktion in Foto 1 am Ende dieses Dokumentes sehen.

ANMERKUNG: ICAb Reaktionen sind, durch ihre Natur, viel schwächer als Reaktionen für ANA oder die meisten anderen Immunofluoreszenzantikörperreaktionen.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Gelegentlich können Seren das starke Beflecken für ANA oder andere Antikörpern ausstellen. Diese können die Fähigkeit behindern, Inselzelle Antikörper zu ermitteln. In solchen Fällen kann das Titrieren des Serums die Sichtbarmachung der Inselzelle Antikörper ermöglichen. In anderen Fällen kann ihr Titer als niedriger sein, der ANA oder andere Antikörper und möglicherweise nicht folglich ermittelt werden können.

Der Inselzelle Antikörpertest sollte nicht an durchgeführt werden grob hämolytische, durch Mikroben verschmutzte oder lipämische Proben. Diese Methode sollte für die Prüfung nur der menschlichen Serumproben verwendet werden.

ERWARTETE WERTE

Ungefähr 50-80% von Neu angriff Diabetikern sind für Inselzelle Antikörper positiv. Das Vorherrschen der Inselzelle Antikörper in den nicht-zuckerkranken Erstgrad Verwandten und in den nicht-zuckerkranken normalen Themen ist berichtet worden, um 2-5% und 0.25-1.7%, zu sein beziehungsweise⁵⁻¹⁶. Ungefähr 11% von Inselzelle Antikörper positiven Erstgrad Verwandten entwickeln Diabetes jedes Jahr. Abstände von so lang wie 8 Jahre zwischen Abfragung der Inselzelle Antikörper und dem Angriff von Diabetes sind berichtet worden. ICAb Ausdehnung in Tabelle 1 am Ende dieses Dokumentes sehen.



ImmuGlo™

ANTI-Cellule Isolette (ICAb) Sistema

IVD

REF

1123

40 Determinations

Dosaggio in immunofluorescenza indiretta per l'individuazione e la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi di cellule delle isolette di Langerhans (ICAb) nel siero umano. Gli anticorpi sono presenti nel siero dei pazienti con di diabete melito insulina dipendenti (IDDM).

CARATTERISTICHE GENERALI

Il diabete è una malattia metabolica cronica e complessa influenzata dai vari fattori ereditari ed ambientali che provocano l'incapacità del corpo di effettuare l'uso dei carboidrati, dei grassi e delle proteine. La circostanza, caratterizzata dai livelli elevati del glucosio di anima, è causata da una mancanza nella produzione dell'insulina o da un danno di utilizzazione dell'insulina. La maggior parte dei casi del diabete entrano in due categorie cliniche: IDDM (diabete tipo I) e NIDDM (diabete tipo II).

L'amministrazione di prognosi, di trattamento e di malattia è differente per ogni tipo. È accettato bene che IDDM è una malattia autoimmune che designa gli β cellule delle isolette di Langerhans come bersaglio nel pancreas. La risposta autoimmune ai antigeni cellulari isoletti trae le risposte fuori dell'anticorpo agli antigeni quali il glutamic acid decarboxylase (GAD), ICA-512 ed insulina. Sono stati trovati per essere indicatori altamente preventivi, specialmente se presente nell'alto titolo ¹⁻¹⁵. La rilevazione di questi ICAb dall'immunofluorescenza indiretta (IF) sul substrato del pancreas è considerata la parità aurea per la diagnosi di IDDM ^{16,17}. Questi ICAb citoplasmici attualmente sono usati per la previsione di diabete tipo I ¹⁸⁻²⁰.

ICAb sono rilevati in fino a 90% dei pazienti diabetici recentemente diagnosticati. Nello studio della famiglia di Bart's-Windsor, 100% dei primi parenti di grado dei pazienti di IDDM con ICAb > 80 unità di JDF ha diventare IDDM in 10 anni. Il livello elevato di ICAb sembra essere prima dell'inizio di tipo il diabete di I e diminuisce progressivamente da allora in poi ^{12,18}. ICAb hanno parecchie specificità distinte e mostrano due modelli importanti della reattività ⁴. Il primo modello si limita principalmente agli β -celluli. Il secondo macchia tutte le cellule all'interno dell'isolotto ed è il modello di macchiatura classico per ICAb citoplasmico.

PRINCIPIO DEL METODO

Nella metodica in immunofluorescenza indiretta utilizzata in questo kit, i sieri dei pazienti vengono incubati su sezioni del primate pancreas per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Tutti gli anticorpi non legati vengono eliminati sciacquando il vetrino, mentre gli anticorpi legati del tipo IgG vengono individuati mediante incubazione del substrato con coniugato, marcato con fluoresceina. Per osservare le reazioni si utilizza un microscopio a fluorescenza dotato di filtri adatti. Una fluorescenza verde mela rivestimento di cellule delle isolette di Langerhans conferma la presenza di ICAb. Mediante l'analisi di diluizioni seriali si determina quindi il titolo (il reciproco della diluizione più elevata che causa una reazione positiva).¹⁴

CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a una temperatura di 2-8°C. I reagenti sono pronti per l'uso dopo averli portati a temperatura ambiente.

Materiali forniti

ImmuGlo™ ICAb IFA **REF** 1123

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 40 determinazioni ciascuno.

10 x	SORB SLD 4	Vetrini-substrato di sezioni del primate pancreas con 4 pozzetti
1 x 0,5 ml	CONTROL + ICA *	Controllo positivo ICAb , siero umano. Contiene ICAb, standardizzato nelle unità di JDF.
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Controllo negativo , siero umano
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Coniugato FITC IgG . Tenere lontano dalla luce.
1 x 5 ml	CONJ B *	Coniugato B . Tenere lontano dalla luce.
1 x 60 ml	BUF *	Diluyente per campioni
2 flaconcini	BUF WASH	Tampone fosfato-salino (PBS) . Ricostituire ciascun flaconcino con 1 litro d'acqua
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Mezzo Montante . Non congelare.
1 x 1,0 ml	EVANS	Blu di Evans
1 x 12	COVER SLD	Vetrini coprioggetto

* Contiene < 0.1% NaN₃

Materiali necessari ma non forniti

Microscopio a fluorescenza
Micropipetta o pipetta Pasteur
Pipette sierologiche
Piastra di colorazione (ad esempio vaschetta di Coplin)
Piccole provette (ad es. 13 x 75 mm) e porta provette
Acqua distillata o deionizzata
Contenitore da 1 litro
Bottiglia di lavaggio
Carta assorbente
Incubatore

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. Il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato controllato ed è risultato negativo ai test richiesti dalla FDA per la presenza dell'HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I. Tuttavia, maneggiare tutti i campioni di siero umano e

i prodotti di origine umana come fonte potenziale di infezione, indipendentemente dalla loro origine, seguendo le normali pratiche di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e l'eliminazione di questi materiali¹⁴. **ATTENZIONE** - La sodio azide (NaN_3) può dar luogo a reazioni chimiche pericolose. Per lo smaltimento dei residui delle analisi attenersi scrupolosamente alle norme CDC e alle norme di legge in materia. La sodio azide è tossica, se ingerita; in questo caso, informare immediatamente il responsabile del laboratorio o un centro per casi di avvelenamento.

Al fine di assicurare risultati validi, si raccomanda di attenersi alle istruzioni riportate in questo inserto. Non scambiare i componenti del kit se non con quelli aventi lo stesso numero di catalogo della IMMCO. Non utilizzare oltre la data di scadenza.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare soltanto campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o contaminati possono influenzare i risultati del test e vanno scartati. Conservare i campioni a una temperatura di 2-8°C per non oltre una settimana. Per periodi di conservazione più lunghi, congelare il siero a -20°C, evitando di congelare i campioni più volte.

PROCEDURA

Metodica d'analisi

A. Screening

1. Diluire ciascun siero di paziente 1:5 con il Diluente per Campioni fornito (0,1 ml di siero + 0,4 ml di Diluente). **Non diluire i Controlli Positivi o Negativi**. Conservare i sieri non diluiti per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che i sacchetti contenenti i vetrini-substrato raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti, quindi estrarre i vetrini facendo attenzione a non toccare il substrato.
3. Marcare i vetrini e porli in una camera umida.
4. Capovolgere il flaconcino contagocce e versare delicatamente 1 goccia (circa 50 μl) del Controllo Negativo nel pozzetto no. 1. Allo stesso modo versare 1 goccia del Controllo Positivo nel pozzetto no. 2, evitando di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Con una micropipetta o con la pipetta Pasteur, versare 1 goccia del siero diluito del paziente (circa 50 μl) negli altri pozzetti, evitando di riempirli eccessivamente.
6. Mettere il coperchio sulla camera umida ed incubare i vetrini per 18-24 ore a temperatura ambiente.
7. Togliere un vetrino dalla camera umida. Tenendo il vetrino per l'estremità della linguetta, sciacquarlo delicatamente con circa 10 ml di PBS utilizzando una pipetta o sciacquarlo in un becher pieno di PBS. Non utilizzare la bottiglia di lavaggio. Trasferire il vetrino immediatamente nella vaschetta di Coplin e lavare per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
8. Togliere il/i vetrino/i dalla vaschetta di Coplin. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Porre il vetrino nella camera umida. Capovolgere immediatamente il flaconcino contagocce del Coniugato FITC e versarne delicatamente 1 goccia (circa 50 μl) in ciascun pozzetto. Ripetere i punti 7 e 8 per ciascun vetrino.
9. Riporre il coperchio sulla camera umida ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
10. Ripetere i punti 7-9 con il Coniugato B al posto di Coniugato FITC.
11. Togliere un vetrino dalla camera umida e tenendolo per l'estremità della linguetta, immergerlo in un becher pieno di PBS per togliere il coniugato in eccesso. Porre il/i vetrino/i in una piastra di colorazione piena di PBS per 10 minuti. Se si desidera, si possono aggiungere 2-3 gocce di Blu di Evans al lavaggio finale. Ripetere per gli altri vetrini. **NOTA:** Un lavaggio scorretto può aumentare la fluorescenza della priorità bassa.
12. Togliere un vetrino dalla piastra di colorazione. Asciugare il bordo del vetrino su della

carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Per evitare che il vetrino si secchi, passare immediatamente al punto 13 mentre è ancora bagnato.

13. Montare il vetrino coprioggetto versando delicatamente 3 **gocce** uniformemente di Terreno di allestimento su vetrino coprioggetto, quindi porre il coprioggetto sul vetrino. Non applicare eccessiva pressione ed evitare che il coprioggetto si sposti lateralmente.
14. Ripetere i punti 12 e 13 per ciascun vetrino.
15. Esaminare la fluorescenza specifica con un microscopio a fluorescenza a un ingrandimento di almeno 200x.

I vetrini si possono leggere appena vengono preparati. Tuttavia, grazie a un agente anti evanescenza presente nel liquido di montaggio, non si verifica alcuna perdita significativa di intensità di colorazione, se la lettura viene posticipata fino a 48 ore. I vetrini devono essere conservati al buio a una temperatura di 2-8°C.

B. Determinazione dell'endpoint (Titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere ulteriormente analizzato seguendo i punti da 5 a 13 per determinarne il titolo. Ciascuna sessione analitica deve includere i Controlli Positivi e Negativi. Effettuare diluizioni seriali doppie partendo da 1:5. Il reciproco della diluizione più elevata che produce una reazione positiva è il titolo.

Se il titolo di controllo positivo è entro i limiti definiti dalle specifiche incluse di QC, i livelli del siero del ricoverato dell'anticorpo possono allora essere segnalati nelle unità di JDF¹⁶. Il valore unità JDF del controllo positivo è stampato sull'etichetta della fiala. Per calcolare il valore unità JDF del siero sconosciuto, dividere semplicemente il titolo dello sconosciuto dal titolo del controllo positivo e per moltiplicare questo per le unità di JDF sull'etichetta di controllo positivo.

Esempio:

Controllo Positivo titolo: 1:4. Esemplare titolo 1:10. Etichetta Controllo Positivo: 160 unità JDF.

Calcolo:

$$\text{Concentrazione ICAb: } \frac{10}{4} \times 160 = 400 \text{ unità JDF}$$

Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare quattro provette da 1 a 4. Aggiungere 0,4 ml di Diluente per Campioni alla provetta 1 e 0,2 ml alle provette da 2 a 4. Pipettare 0,05 ml di siero non diluito nella provetta 1 e mescolare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta all'altra dopo aver mescolato per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

Provette	1	2	3	4
Siero	0,1 ml			
	+			
Diluente tamponato	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻
Trasferimento		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluizione finale	1:5	1:10	1:20	1:40 etc.

CONTROLLO DI QUALITA'

Ciascuna sessione analitica deve comprendere sia un Controllo Positivo che uno Negativo. Il Controllo Negativo non deve mostrare alcuna fluorescenza specifica dei rivestimento endomysio dei pacchi lisci del muscolo, mentre il Controllo Positivo deve avere un'intensità di colorazione dei tubi di queste strutture di almeno 2+ con il controllo positivo EMA.

Se non si ottengono i risultati attesi, bisognerà ripetere l'analisi. Se continuano a verificarsi risultati inadeguati con i controlli, le cause possono essere:

- Torbidità. Scartare e utilizzare un altro controllo.
- Problemi al sistema ottico del microscopio a fluorescenza, quali allineamento non corretto, bulbo scaduto, ecc.
- Essiccamento del vetrino durante la procedura.

RISULTATI

I risultati delle prove per gli anticorpi delle cellule dell'isolotto dovrebbero essere segnalati come negativo (< 5) o positivo con il titolo o le unità di JDF⁹.

Colto per la macchiatura specifica del citoplasma dei cellule delle isolette di Langerhans. I vari anticorpi del tessuto quali gli anticorpi antinucleari (ANA), gli anticorpi mitocondriali e gli anticorpi del muscolo liscio possono anche essere osservati sulle sezioni del pancreas. I sieri che danno c'è ne di queste reazioni dovrebbero essere segnalati come negazione per gli anticorpi alle cellule dell'isolotto. Tutti i sieri che danno le reazioni di macchiatura nucleare possono essere esaminati sulle cellule HEP-2 o sulle sezioni del fegato del mouse. Tutti i sieri che danno il muscolo liscio o le reazioni di macchiatura mitocondriali possono essere esaminati sulle sezioni del topo rene/stomaco. Vedere la reazione positiva di ICAb in foto 1 all'estremità di questo documento.

NOTA: Le reazioni di ICAb sono, per la loro natura, molto più debole delle reazioni per ANA o la maggior parte delle altre reazioni dell'anticorpo di immunofluorescenza.

LIMITI DELLA PROCEDURA

I sieri possono esibire occasionalmente la macchiatura forte per ANA o altri autoanticorpi. Questi possono interferire con la capacità di rilevare gli anticorpi delle cellule dell'isolotto. In tali casi, titolare il siero può consentire la visualizzazione degli anticorpi delle cellule dell'isolotto. In altri casi il loro titolo può essere più basso di il ANA o altri anticorpi e quindi non può essere rilevato.

La prova dell'anticorpo delle cellule dell'isolotto non dovrebbe essere effettuata sopra grossolanamente emolizzati, campioni da microbi contaminati o lipemici. Questo metodo dovrebbe essere usato per la prova dei campioni umani del siero soltanto.

VALORI ATTESI

Circa 50-80% dei diabetici di nuovo-inizio è positivo per gli anticorpi delle cellule dell'isolotto. La prevalenza degli anticorpi delle cellule dell'isolotto nei parenti non-diabetici di primo-grado e negli oggetti normali non-diabetici è stata segnalata per essere 2-5% e 0.25-1.7%, rispettivamente ⁵⁻¹⁶. Circa 11% dei parenti positivi di primo-grado dell' ICAb sviluppano ogni anno il diabete. Gli intervalli di finchè 8 anni fra rilevazione degli ICAb e l'inizio del diabete sono stati segnalati. Vedere l'incidenza di ICAb in tabella 1 all'estremità di questo documento.



Immuglo™ Anti-Cela Ilhota (ICAb) Teste

IVD

IMMCO
DIAGNOSTICS

REF

1123

40 Determinations

Teste de anticorpos de imunofluorescência indirecta para a detecção e semi-quantificação de anticorpos anti-celas ilhotas (ICAb) no soro humano. ICAb ajuda no diagnóstico de diabetes insulina dependente (IDDM).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O diabetes é uma doença metabólica crônica e complexa influenciada pelos vários fatores hereditários e ambientais que resultam na inabilidade do corpo manter o uso dos hidratos de carbono, das gorduras e das proteínas. A circunstância, caracterizada por níveis elevados do glicose do sangue, é causada por uma deficiência na produção do insulina ou por um debilitamento da utilização do insulina. A maioria de casos do diabetes caem em duas categorias clínicas: IDDM (tipo I diabetes) e NIDDM (tipo II diabetes).

A gerência do prognóstico, do tratamento e da doença é diferente para cada tipo. Aceita-se bem que IDDM é uma doença autoimune que alveja β -celas do celas ilhotas de Langerhans no pancreas. A resposta autoimune aos celas ilhotas antígenos elicia respostas do anticorpos aos antígenos tais como o glutamic acid decarboxylase (GAD), o ICA-512 e o insulina. Foram encontrados para ser marcadores altamente prognóstico, particularmente se atual no titulação elevado¹⁻¹⁵. A detecção destes ICAb pelo imunofluorescência indireto (IF) na carcaça do pâncreas é considerada o padrão de ouro para o diagnóstico de IDDM^{16,17}. Estes ICAb citoplasmático são usados atualmente para a predição do tipo I diabetes¹⁸⁻²⁰.

ICAb são detectados em até 90% de pacientes diabéticos recentemente diagnosticados. No estudo da família de Bart's-Windsor, 100% dos primeiros parentes do grau de pacientes de IDDM com ICAb > 80 unidades de JDF progrediu a IDDM dentro de 10 anos. O nível de ICAb parece ser o mais elevado antes do início do diabetes tipo I e diminui progressivamente depois disso^{12,18}. ICAb têm diversos especificações distintos e mostram dois testes padrões principais do reatividade⁴. O primeiro teste padrão é restringido predominante aos β -celas. O segundo mancha todas as pilhas dentro do ilhotas, e é o teste padrão manchando clássico para ICAb citoplasmático.

PRINCÍPIOS DO MÉTODO

No método de imunofluorescência indirecto usado neste kit, o soro dos pacientes é incubado em seções do primata pâncreas para permitir a ligação de anticorpos ao substrato. Quaisquer anticorpos livres são removidos através da lavagem da lâmina. Os anticorpos ligados da classe IgG são detectados através da incubação do substrato com conjugado fluoresceínico. As reacções são observadas ao microscópio fluorescente equipado com filtros apropriados. A presença de ICAb é demonstrada por uma fluorescência verde maçã os celas ilhotas. A titulação (o recíproca da maior diluição com reacção positiva) é então determinado através da testagem de várias diluições¹⁴.

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

Armazenamento e preparação

Guardar todos os reagentes a 2-8°C. Os reagentes estão prontos a usar após ficarem à temperatura ambiente.

Material fornecido

ImmuGlo™ ICAb IFA **REF** 1123

Os jogos contêm reagentes suficientes para executar 40 determinações cada uma.

10x	SORB SLD 4	Lâminas de substrato ICAb de 4 poços
1 x 0,5 ml	CONTROL + ICA *	Controlo positivo ICAb , soro humano. Contem ICAb, estandardizado em unidades de JDF.
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo , soro humano.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Conjugado ITCF IgG . Proteger da luz.
1 x 5 ml	CONJ B *	Conjugado B . Proteger da luz.
1 x 60 ml	BUF *	Diluyente de amostras com BSA
2 vials	BUF WASH	Tampão fosfato alcalino (PBS) . Dissolver cada frasco num litro.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Meio de suporte . Não congelar.
1 x 1,0 ml	EVANS	Contra corante Azul de Evans .
1 x 12	COVER SLD	Tampas

* Contem < 0.1% NaN₃

Material necessário mas não fornecido

Microscópio de fluorescência
Micropipeta ou pipeta Pasteur
Pipetas serológicas
Prato de coloração (ex: Coplin)
Tubos pequenos (ex: 13 x 75 mm) e suportes de tubos
Água destilada ou desionizada
Contentor de 1 litro
Garrafa de lavagem
Toalhetes
Câmara de incubação

AVISOS E PRECAUÇÕES

Para o diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes derivados dos humanos utilizados foram testados para HbsAg, VHC, HIV-1 e 2 e HTLV-I e deram negativos nos testes FDA. Todos os espécimens de soro humano e produtos derivados dos humanos devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem-se respistar as boas práticas laboratoriais na armazenagem, distribuição e manuseamento destes materiais¹⁴. AVISO: A azida sódica (NaN₃) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação de tais azidas. A azida sódica pode ser tóxica se

ingerida. Se ingerida, contacte imediatamente o director de laboratório ou um centro de envenenamento.

As instruções devem ser seguidas à risca de forma a assegurar resultados válidos. Não trocar componentes dos kits com outros de outras origens. Todos devem ser do mesmo nº da IMMCO. Não utilizar se estiverem fora do prazo.

RECOLHA DE AMOSTRAS E PREPARAÇÃO

Só os espécimens séricos devem ser utilizados para este teste. Os espécimens hemolizados, lipémicos ou contaminados microbianamente podem interferir com a performance do teste e não devem ser usados. Armazenar a 2-8°C durante apenas uma semana. Para armazenamento mais longo devem ser congelados a -20°C. Evitar repetidas congelações e descongelações.

MODO OPERATÓRIO

Método do teste

A. Despistagem

1. Diluir cada soro 1:5 com o Diluente de amostras fornecido (0,1 ml soro + 0,4 ml Diluente). Não diluir os Controlos Negativo e Positivo. Guardar o soro não diluído para determinar a titulação de anticorpos, se os testes de despistagem forem positivos.
2. Deixar as bolsas com as lâminas de substrato à temperatura ambiente 10-15 minutos. Retirar as lâminas sem tocar no substrato.
3. Etiquetar as lâminas e colocar na incubadora com toalhetes húmidos para não secarem.
4. Inverter o frasco conta-gotas e apertar para aplicar 1 gota (cerca de 50 µl) de Controlo negativo no poço #1. Coloque 1 gota de Controlo Positivo no poço #2. Não encher demais.
5. Com uma micropipeta ou pipeta Pasteur, colocar 1 gota do soro diluído do paciente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demais os poços.
6. Colocar a tampa na incubadora e incubar 18-24 horas à temperatura ambiente.
7. Retirar a lâmina da incubadora. Segurar pela extremidade e lavar com 10 ml de PBS com uma pipeta, ou lavar com recipiente cheio de PBS. Não usar a garrafa de lavagem. Colocar a lâmina no recipiente Coplin e lavar 10 minutos. Repetir a operação para todas as lâminas.
8. Retirar a lâmina do recipiente Coplin. Limpar as extremidades da lâmina num toalhete para retirar o excesso de PBS. Colocar a lâmina na incubadora. Inverter imediatamente o frasco conta-gotas do Conjugado FITC e deitar 1 gota (cerca de 50 µl) em cada poço. Repetir passos 7 e 8 para cada lâmina.
9. Colocar a tampa da incubadora. Incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
10. Repetir passos 7 - 9 com o Conjugado B no lugar de Conjugado FITC.
11. Retirar uma lâmina da incubadora. Segurar na lâmina e mergulhá-la num recipiente com PBS para remover o excesso de conjugado. Colocar a lâmina num disco de coloração com PBS durante 10 minutos. Pode colocar 2-3 gotas de contracorante azul de Evans à lavagem final. NOTA: Uma lavagem deficiente pode alterar a morfologia dos neutrófilos e levar a um aumento da fluorescência.
12. Retirar a lâmina do prato de coloração. Limpar o excesso de PBS. Para evitar que a lâmina seque deve passar para o ponto 13 enquanto a lâmina ainda está molhada.
13. Colocar a tampa e aplicar 3 gota de Meio de Suporte uniformemente em tampas e colocar a tampa. Não faça muita pressão e evite deslizamento lateral da tampa.
14. Repetir passos 12 e 13
15. Examinar a fluorescência específica com microscópis fluorescente com aumento de 200x ou mais.

As lâminas devem ser lidas quando estão prontas. Contudo, devido à presença de um agente anti-desaparecimento no meio de suporte, não há perdas significativas de intensidade

de coloração, se a leitura for adiada até 48 horas. As lâminas devem ser guardadas às escuras a 2-8°C.

B. Determinação (titulação)

Um soro positivo na despistagem pode ser ainda mais testado com os passos 5 a 13. Para determinar a titulação. Cada teste deve incluir os Controlos Positivo e Negativo. Fazer duas diluições começando com 1:5. O recíproco da diluição mais elevada a produzir uma reacção positiva é a titulação.

Se o titulação do controle positivo estiver dentro dos limites definidos pelas especificações incluídas de QC, os níveis do anticorpo no soro paciente podem então ser relatados nas unidades de JDF¹⁶. O valor de unidade JDF do controle positivo é imprimido na etiqueta do frasco. Para calcular o valor de unidade JDF do soro desconhecido, para dividir simplesmente o titulação do desconhecido pelo titulação do controle positivo e para multiplicar isto pelas unidades JDF na etiqueta positiva do controle.

Exemplo:

Controle Positivo titulação: 1:4. Sample titulação: 1:10. Rótulo Controle Positivo: 160 unidades JDF.

Cálculo:

$$\text{Concentração ICAb: } \frac{10}{4} \times 160 = 400 \text{ unidades JDF}$$

Preparação de diluições em série

Numerar 4 tubos de 1 a 4. Juntar 0,4 ml de diluente ao tubo 1 e 0,2 ml aos tubos 2 a 4. Pipetar 0,1 ml de soro não diluído para o tubo 1 e mexer bem. Transferir 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e mexer bem. Continuar a transferir 0,2 ml de um tubo para o outro após mexer.

Tubos	1	2	3	4
Soro	0,1 ml			
	+			
Diluente tamponado	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻
Transferência		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluição final	1:5	1:10	1:20	1:40 etc.

CONTROLO DA QUALIDADE

O Controlo Positivo e o Negativo devem ser incluídos em cada teste. O Controlo Negativo não deve ter fluorescência específica do forro endomysial dos pacotes lisos do músculo, enquanto que o Controlo Positivo deve ter 2+ ou maior intensidade de coloração do tubos destas estruturas.

Se não se obtiverem os resultados esperados, o teste deve ser repetido. Se resultados inadequados continuarem a ocorrer com os controlos, pode deverse a:

- Turbos. Usar outro controlo.
- Problemas no sistema óptico do microscópio de fluorescência: alinhamento incorrecto, lâmpada a precisar de ser mudada, etc.
- Lâmina seca durante o processo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos testes para ICAb devem ser relatados como o negativo (< 5) ou positivo com titulação ou unidades de JDF⁹.

Lido para manchar específico do citoplasma dos celas ilhotas. Vário outros anticorpos do tecido tais como os anticorpos antinuclear (ANA), anticorpos mitochondrial, e anticorpos do músculo liso podem também ser observados em seções do pâncreas. Os soro que dão algumas destas reacções devem ser relatados como o negativo para anticorpos às celas

ilhas. Todos os soro que dão reações manchando nucleares podem ser testados nas celas HEp-2 ou nas seções do fígado do rato. Todos os soro que dão o músculo liso ou reações manchando mitocondrial podem ser testados em seções do rato rim/ estômago. Ver a reação positiva de ICAB na foto 1 na extremidade deste original.

NOTA: As reações de ICAB são, por sua natureza, muito mais fraca do que reações para ANA ou a maioria outras de reações imunofluorescências do anticorpos.

LIMITAÇÕES DO MODO OPERATÓRIO

Ocasionalmente os soro podem exibir manchar forte para ANA ou outros autoanticorpos. Estes podem interferir com a habilidade de detectar anticorpos da celas ilhotas. Nesses casos, titulação o soro pode permitir o visualização dos ICAB. Em outros casos seu titulação pode ser mais baixo do que o ANA ou outros anticorpos e daqui não podem ser detectados. O teste do ICAB não deve ser executado sobre hemolyzadas bruta, amostras microbial contaminadas ou lipemicas. Este método deve ser usado testando amostras humanas do soro somente.

VALORES ESPERADOS

Aproximadamente 50-80% de diabetics do novo-início são positivos para ICAB. O prevalência de ICAB em parentes non-diabetic do primeiro-grau e em assuntos normais non-diabetic foi relatado para ser 2-5% e 0.25-1.7%, respectivamente ⁵⁻¹⁶.

Aproximadamente 11% de parentes positivos do primeiro-grau do ICAB desenvolvem o diabetes cada ano. Os intervalos de tão por muito tempo quanto 8 anos entre a detecção de ICAB e o início do diabetes foram relatados. Ver a incidência de ICAB na tabela 1 na extremidade deste original.

REFERENCES • REFERENCIAS • LITERATUR • RIFERIMENTI

1. Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J et al. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin dependent diabetes. *New Engl J Med*; 1990, 323:1167-1172.
2. Neufeld M, Maclaren NK, Riley WJ et al. Islet cell and other organ-specific antibodies in U.S. Caucasians and Blacks with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*; 1980, 29:589-592.
3. Gianani R, Pugliese A, Bonner-Weir S et al. Prognostically significant heterogeneity of cytoplasmic islet cell antibodies in relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes*; 1992, 41:347-353.
4. Ziegler AG, Herskowitz RD, Jackson RA et al. Predicting Type I Diabetes. *Diabetes Care*; 1990, 13:762-775.
5. Gale EAM and Bottazzo GF. Can we predict type I (insulin dependent) diabetes? In "World Book of Diabetes in Practice"; 1986, Vol 2, Krall L, Ed, Elsevier, New York, 25-29.
6. Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J et al. Evidence for a long pre-diabetic period in Type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Lancet*; 1981, 2:1363-1365.
7. Tarn AC, Bonifacio E, Dean BM et al. Predicting insulin-dependent diabetes (Letter). *Lancet*; 1988, 2:627-628.
8. Jackson RA, Soeldner JS and Eisenbarth GS. Predicting insulin-dependent diabetes (Letter). *Lancet*; 1988, 2:627-628.
9. Srikanta S, Ganda OP, Gleason RE et al. Pre-type I diabetes: linear loss of beta cell response to intravenous glucose. *Diabetes*; 1984, 33:717-720.
10. Srikanta S, Ganda OP, Rabizadeh A et al. First degree relatives of patients with type I diabetes mellitus: islet cell antibodies and abnormal insulin secretion. *N Engl J Med*; 1985, 313:461-464.
11. Srikanta S, Ganda OP, Jackson RA et al. Pre-type I diabetes: common endocrinologic course despite immunologic and immunogenetic heterogeneity. *Diabetologia*; 1984, 27:146-149.
12. Riley WJ, Spillar RP, Waltz J and Brody B. Predictive value of islet cell antibodies (ICA) - 6 years experience (Abstract). *Diabetes*, 1983, 33 (Supp 1):44A.
13. Riley W, Maclaren N, Spillar RP et al. Predictive value of ICA for IDD and insulinopenia to iv glucose (Abstract): *Diabetes* 37 1988, (Issue 5 Suppl): 5A.
14. Maclaren NK, Horne G, Spillar RP et al. Islet cell antibodies (ICA) in U.S. school children (Abstract). *Diabetes*; 1985, 34 (Suppl 1):84A.
15. Spencer KM, Tarn A, Dean BM et al. Fluctuating islet cell autoimmunity in unaffected relatives of patients with insulin dependent diabetes. *Lancet*; 1984, 1:764-766.
16. Greenbaum J, Palmer JP, Nagataki S et al. Improved specificity of ICA assays in the fourth international immunology of diabetes serum exchange workshop. *Diabetes*; 1992, 41:1570-1574.
17. Bonifacio E, Lemmark A, Dawkins RL et al. Serum exchange and use of dilutions have improved precision of measurement of islet cell antibodies. *J Immunol Methods*; 1988, 106:83-88.
18. Kolb H, Dannehl K, Gruenkelee D et al. Prospective analysis of islet cell antibodies in children with type I (insulin dependent) diabetes; 1988, *Diabetologia*; 1988, 31:189-194.
19. Srikanta S, Ganda OP, Jackson RA et al. Type I diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive cell destruction. *Ann Intern Med*; 1983, 99:320-326.
20. Betterle C, Presotto F, Pedini B et al. Islet cell and insulin autoantibodies in organ specific autoimmune patients: their behavior and predictive value for the development of type I diabetes mellitus: a 10 year follow-up study. *Diabetologia*; 1987, 30:292-297.
21. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York; 1987, 3rd Ed, 3-40.
22. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. [HHS Pub. No. (CDC) 1993, 93-8395].

Photo 1. ICAb Staining Reaction

Note specific staining of the cytoplasm of the islet of Langerhans.

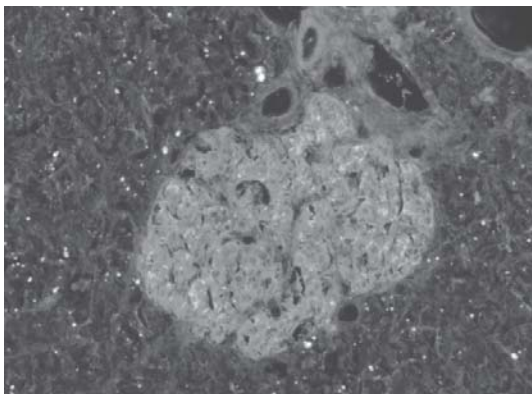


Table 1. Incidence of Anti-Islet Cell Antibodies

Disease Group	Age (years)	No. Patients examined	% Positive
Type I Diabetes (IDDM)	at onset		
	<1-10	19	63
	11-20	25	60
	21-40	8	25
	long standing		
	<1-10	22	41
	11-20	71	39
21-40	26	24	
41-70	13	0	
71-80	3	33	
Type II Diabetes (NIDDM)	at onset		
	<1-40	0	-
	41-80	39	3
	long standing		
	<1-10	0	-
11-20	5	20	
21-80	75	1	
Non-diabetic first-degree relatives	<1-30	61	0
	31-50	119	2
	51-80	19	0
non-diabetic controls	>18	200	0

For technical assistance please contact:



IMMCO
DIAGNOSTICS

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

www.emergogroup.com