

ISLET CELL ANTIBODY (ICA_b) TEST SYSTEM

IVD

PRODUCT INSERT

REF	1123 ICA (Primate Pancreas) 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 ICA_b's by indirect immunofluorescence (IF) on pancreas substrate is considered the gold standard for diagnosis of IDDM^{16,17}. These cytoplasmic ICA_b's are currently used for the prediction of type I diabetes¹⁸⁻²⁰. ICA_b'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 ICA_b's >80 JDF units progressed to IDDM within 10 years. The level of ICA_b's appears to be highest prior to the onset of Type I diabetes and diminishes progressively thereafter^{12,18}. ICA_b'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 ICA_b'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™ ICA_b Primate Pancreas

REF	1123
-----	------

Kits contain sufficient reagents to perform 40 determinations each.

10 x

SORB	SLD	4
------	-----	---

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.**

EN

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

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

1 x 5 ml **CONJ B**

1 x 60 ml **BUF ICA**

2 vials **BUF WASH**

1 x 5 ml **MOUNTING MEDIUM**

1 x 12 ml **COVER SLD**

Optional Components

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

1 x 1 ml **EVANS**

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

Negative Control. Contains human serum.

Anti-human IgG FITC Conjugate containing Evan's Blue. Protect from light.

Conjugate B. Protect from light.

ICA Sample Diluent.

Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.

Mounting Medium. Do not freeze.

Coverslips.

REF 2100X - Anti-human FITC Conjugate. Protect from light.

REF 2510* - Evan's Blue Counterstain.

REF 2099 - Anti-human IgG FITC Conjugate. Protect from light. Conjugate minimizes background reactions on primate tissues.

Symbols used on labels:

LOT Lot number

REF Catalog number

 Use by

 Storage temperature

 Consult instructions for use

IVD In vitro diagnostic use

 Manufacturer

 Number of Tests

 Date of Manufacture



Danger. May cause cancer. Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection. Store locked up. Dispose of contents/container to comply with local, state and federal regulations.

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 Diagnostics Inc. 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 2°-8°C.
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 optional conjugate without counterstain is used (see optional components in Materials Provided Section), 2-3 drops of Evan's Blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.

EN

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.

EN

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 isletofLangerhans. 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-diabetic⁵⁻¹⁶ normal subjects has been reported to be 2-5% and 0.25-1.7%, respectively. 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.

ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΝΗΣΙΔΙΩΝ (ICAb)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1123 ICA (Παγκρέατος πρωτεϊνών) 40 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια ανάλυση έμμεσο ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων κατά των κυττάρων νησιδίων σε ορό ανθρώπου, για την υποβοήθηση της διάγνωσης του *ινσουλινοεξαρτώμενου σακχαρώδη διαβήτη* (IDDM).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Ο διαβήτης είναι μια χρόνια και πολύπλοκη μεταβολική νόσος που επηρεάζεται από διάφορους κληρονομικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, η οποία οδηγεί σε αδυναμία του σώματος να συνεχίσει να χρησιμοποιεί υδατάνθρακες, λίπη και πρωτεΐνες. Η νόσος, που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, προκαλείται από ανεπάρκεια στην παραγωγή ινσουλίνης ή από διαταραχή της χρήσης της. Τα περισσότερα περιστατικά διαβήτη εμπίπτουν σε δύο κλινικές κατηγορίες: στον *ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη* (IDDM ή διαβήτη τύπου I) και στον *μη ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη* (NIDDM ή διαβήτη τύπου II). Η πρόγνωση, η θεραπεία και η αντιμετώπιση της νόσου είναι διαφορετικές για κάθε τύπο. Έχει γίνει αποδεκτό ότι ο IDDM είναι μια αυτοάνοση νόσος που στοχεύει τα β-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans στο πάγκρεας. Η αυτοάνοση απόκριση στα αντιγόνα των κυττάρων νησιδίων προκαλεί αποκρίσεις αντισωμάτων κατά αντιγόνων όπως είναι η αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος (GAD), το ICA-512 και η ινσουλίνη. Τα αντισώματα αυτά έχουν βρεθεί ότι είναι πολύ καλοί προγνωστικοί δείκτες, ειδικά εάν υπάρχουν σε υψηλό τίτλο¹⁻¹⁵. Η ανίχνευση αυτών των ICAb με έμμεσο ανοσοφθορισμό (IF) σε υπόστρωμα παγκρέατος θεωρείται ως η καλύτερη μέθοδος διάγνωσης του IDDM^{16,17}. Αυτά τα κυτταροπλασματικά ICAb χρησιμοποιούνται για την πρόγνωση του διαβήτη τύπου I¹⁸⁻²⁰.

Τα ICAb ανιχνεύονται σε ποσοστό έως και 90% των μόλις διαγνωσθέντων διαβητικών ασθενών. Στην οικογενειακή μελέτη Bart's-Windsor, το 100% των συγγενών πρώτου βαθμού ασθενών με IDDM, με ICAb >80 μονάδες JDF, εμφάνισαν IDDM σε διάστημα 10 ετών. Το επίπεδο των ICAb φαίνεται ότι είναι υψηλότερο πριν από την εκδήλωση του διαβήτη τύπου I και ότι μειώνεται σταδιακά από εκεί και έπειτα^{12,18}. Τα ICAb εμφανίζουν διαφορετικές ειδικότητες και παρουσιάζουν δύο κύρια πρότυπα αντιδραστικότητας⁴. Το πρώτο πρότυπο περιορίζεται κυρίως στα β-κύτταρα. Το δεύτερο προκαλεί χρώση όλων των κυττάρων εντός του νησιδίου και αποτελεί το τυπικό πρότυπο χρώσης για τα κυτταροπλασματικά ICAb.

ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Τα αντισώματα κατά των κυττάρων νησιδίων ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό (IF). Στη μέθοδο αυτή, οι οροί των ασθενών επωάζονται σε τομές παγκρέατος πιθήκου, προκειμένου να επιτευχθεί η δέσμευση των αντισωμάτων στο ιστικό υπόστρωμα. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύονται αφαιρούνται με έκπλυση. Τα αντισώματα τάξης IgG που έχουν δεσμευθεί ανιχνεύονται με την επώαση των τομών αυτών με συζευκτικά αντισώματα τα οποία είναι σημασμένα με φλουοροσκείνη. Οι αντιδράσεις παρακολουθούνται με μικροσκόπιο φθορισμού που διαθέτει τα κατάλληλα φίλτρα. *Η παρουσία των αντισωμάτων κατά των κυττάρων των νησιδίων γίνεται αντιληπτή από το φθορισμό έντονου πράσινου χρώματος του κυτταροπλάσματος των νησιδίων του Langerhans.* Στη συνέχεια, καθορίζεται ο τίτλος (το αντίστροφο της υψηλότερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση) με ανάλυση διαδοχικών αραιώσεων²¹.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια φυλάσσονται στους 2-8°C. Τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση, εφόσον φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

EL

Υλικά που παρέχονται

ImmunoGlo™ ICA Παγκρέατος πρωτευνόντων **REF** 1123

Κάθε kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 40 προσδιορισμών.

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

Αντικειμενοφόροι υποστρώματος παγκρέατος πιθήκου με 4 κυψελίδες.

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

Διάλυμα θετικού ελέγχου ICA. Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά των κυττάρων νησιδίων, τυποποιημένος με βάση το θετικό ορό αναφοράς του JDF (Ίδρυμα Νεανικού Διαβήτη). **Οι μονάδες JDF αναγράφονται στην ετικέτα του φιαλιδίου.**

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

Διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Περιέχει ορό ανθρώπου.

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

Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης **IgG** με χρωστική **Evans Blue**. **Να προστατεύεται από το φως.**

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

Συζευκτικό αντίσωμα B. **Να προστατεύεται από το φως**

1 x 60 ml **BUF** **ICA**

Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων ICA.

2 φιαλίδια **BUF** **WASH**

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Διαλύστε κάθε φιαλίδιο έως όγκο 1 λίτρου.

1 x 5 ml **MOUNTING** **MEDIUM**

Μέσο. Να μην καταψύχεται.

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

Καλυπτρίδες.

Προαιρετικά συστατικά

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

REF 2100X – Συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με **FITC**. **Να προστατεύεται από το φως.**

1 x 1 ml **EVANS**

REF 2510 Επίχρωση **Evans' Blue***

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

REF 2099 – Συζευκτικό αντίσωμα **FITC** κατά της ανθρώπινης **IgG**. **Να προστατεύεται από το φως.** Η κλίση ελαχι στο ποίει τις αντιδράσεις υποβάθρου στους ιστούς αρχιεπισκόπων

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT Αριθμός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου

 Ημερομηνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης

IVD In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

 Ημερομηνία κατασκευής



* Κίνδυνος. Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο.

Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.

Μην το χρησιμοποιήσετε πριν διαβάσετε και κατανοήσετε τις οδηγίες προφύλαξης. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ

έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: Συμβουλευθείτε /

Επισκεφθείτε γιατρό. Να φοράτε προστατευτικά γάντια /

προστατευτικά ενδύματα / μέσα ατομικής προστασίας

για τα μάτια / πρόσωπο. Φυλάσσεται κλειδωμένο.

Φυλάσσεται κλειδωμένο. Διάθεση του περιεχομένου /

περιέκτη στο εγκεκριμένο διάθεσης αποβλήτων.

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Μικροσκόπιο φθορισμού
- Μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur
- Ορολογικές πιπέτες
- Τρυβλίο χρώσης (π.χ. δοχείο Corlin)
- Μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες (π.χ. διαστάσεων 13 x 75 mm) και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Απεσταγμένο ή αποιονισμένο νερό
- Δοχείο ενός λίτρου
- Φιάλη έκπλυσης
- Απορροφητικά χαρτιά
- Θάλαμος επώασης

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HbsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Όλα τα δείγματα ανθρώπινου ορού και τα προϊόντα ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα, ανεξάρτητα από την προέλευσή τους. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έκχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών²².

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μολυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση αυτής της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, ο ορός θα πρέπει να καταψυχθεί στους -20°C. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**Μέθοδος ανάλυσης****A. Διαλογή**

1. Αραιώστε τον ορό κάθε ασθενούς σε αναλογία 1:5 με το διάλυμα αραιώσης δειγμάτων που παρέχεται (0,1 ml ορού + 0,4 ml διάλυμα αραιώσης). Μην αραιώνετε τα διαλύματα θετικού ή αρνητικού ελέγχου. Φυλάξτε τους μη αραιωμένους ορούς για να προσδιορίσετε τους τίτλους αντισωμάτων, εάν οι αναλύσεις διαλογής βρεθούν θετικές.
2. Αφήστε τις θήκες που περιέχουν τις αντικειμενοφόρους του υποστρώματος επί 10-15 λεπτά, προκειμένου φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρέστε προσεκτικά τις αντικειμενοφόρους χωρίς να αγγίξετε το υπόστρωμα.

EL

3. Σημάνετε τις αντικειμενοφόρους και τοποθετήστε τις σε ένα θάλαμο επώασης που έχετε καλύψει με απορροφητικό χαρτί διαβρεγμένο με νερό για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση.
4. Αναστρέψτε το σταγονόμετρο και πιέστε το ελαφρά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl) του διαλύματος αρνητικού ελέγχου στην κυψελίδα υπ' αριθμόν 1. Με τον ίδιο τρόπο, προσθέστε 1 σταγόνα διαλύματος θετικού ελέγχου στην κυψελίδα υπ' αριθμόν 2. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
5. Χρησιμοποιώντας μια μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur, προσθέστε 1 σταγόνα από τον αραιωμένο ορό του ασθενούς (περίπου 50 μl) στις υπόλοιπες κυψελίδες. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
6. Τοποθετήστε το καπάκι στο θάλαμο επώασης και επώαστε τις αντικειμενοφόρους επί 18-24 ώρες σε θερμοκρασία 2°-8°C.
7. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εκπλύνετε με περίπου 10 ml PBS χρησιμοποιώντας μια πιπέτα ή εκπλύνετε την αντικειμενοφόρο σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει PBS. Μη χρησιμοποιείτε φιάλη έκπλυσης. Μεταφέρετε την αντικειμενοφόρο αμέσως στο δοχείο Corlin και εκπλύνετε επί 10 λεπτά. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.
8. Αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους από το δοχείο Corlin. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο σε θάλαμο επώασης. Αναστρέψτε αμέσως το σταγονόμετρο με το συζευκτικό αντίσωμα κατά της IgG που είναι συζευγμένο με FITC και πιέστε μαλακά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl) σε κάθε κυψελίδα.
9. Τοποθετήστε το καπάκι στο θάλαμο επώασης και επώαστε τις αντικειμενοφόρους επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Επαναλάβετε τα βήματα **7 έως και 9** για κάθε αντικειμενοφόρο, χρησιμοποιώντας το συζευκτικό αντίσωμα B αντί του συζευκτικού αντισώματος κατά της IgG που είναι συζευγμένο με FITC.
11. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εμβαπτίστε την σε ένα ποτήρι ζέσεως με PBS για να αφαιρέσετε την περίσσεια συζευκτικού αντισώματος. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε ένα τρυβλίο χρώσης που έχει πληρωθεί με PBS επί 10 λεπτά. Εάν χρησιμοποιηθεί προαιρετικό συζευκτικό αντίσωμα χωρίς επίχρωση (δείτε τα προαιρετικά συστατικά στην ενότητα "Υλικά που παρέχονται"), μπορείτε να προσθέσετε 2-3 σταγόνες επίχρωσης Evans blue στην τελική έκπλυση. Επαναλάβετε για τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τυχόν ακατάλληλη έκπλυση ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένο φθορισμό υποβάθρου.
12. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το τρυβλίο χρώσης. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. **Για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση της αντικειμενοφόρου, προχωρήστε αμέσως στο επόμενο βήμα ενώ η αντικειμενοφόρος είναι ακόμη υγρή.**
13. Εφαρμόστε την καλυπτρίδα, προσθέτοντας **3 σταγόνες** μέσου ομοίμορφα επάνω στην καλυπτρίδα και τοποθετήστε την πάνω στην αντικειμενοφόρο. Αποφύγετε την εφαρμογή άσκοπης πίεσης και αποτρέψτε την πλευρική μετακίνηση της καλυπτρίδας.
14. Επαναλάβετε τα βήματα 12 και 13 για κάθε αντικειμενοφόρο.
15. Εξετάστε για ειδικό φθορισμό με μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση 200x ή μεγαλύτερη.

Οι αντικειμενοφόροι μπορούν να διαβαστούν μόλις προετοιμαστούν. Ωστόσο, εξαιτίας της παρουσίας παράγοντα προστασίας φθορισμού στο μέσο καθήλωσης, δεν εμφανίζεται σημαντική απώλεια της έντασης της χρώσης, εάν καθυστερήσει η ανάγνωση έως και 48 ώρες. Οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να φυλάσσονται σε σκοτεινό χώρο, σε θερμοκρασία 2-8°C.

B. Προσδιορισμός τελικού σημείου (τιτλοδότηση)

Ένα ορό που θα βρεθεί θετικός στην ανάλυση διαλογής μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω, ακολουθώντας τα βήματα 5 έως 13 για να καθοριστεί ο τίτλος του. Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τα διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου. Εκτελέστε διαδοχικές διπλές αραιώσεις ξεκινώντας από την αναλογία 1:5. Ο τίτλος είναι το αντίστροφο της μεγαλύτερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση.

EL

Εάν ο τίτλος του διαλύματος θετικού ελέγχου βρίσκεται εντός των ορίων που καθορίζονται από τις προδιαγραφές ελέγχου ποιότητας που εσωκλείονται, τα επίπεδα του αντισώματος στον ορό του ασθενούς μπορούν να αναφερθούν σε μονάδες JDF¹⁶. Η τιμή της μονάδας JDF του διαλύματος θετικού ελέγχου αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Για να υπολογίσετε την τιμή της μονάδας JDF του άγνωστου ορού, απλώς διαιρέστε τον τίτλο του άγνωστου ορού με τον τίτλο του διαλύματος θετικού ελέγχου και πολλαπλασιάστε το πηλίκο επί τις μονάδες JDF που αναγράφονται στην ετικέτα του διαλύματος θετικού ελέγχου.

Παράδειγμα:

Ο τίτλος του διαλύματος θετικού ελέγχου είναι 1:4. Ο τίτλος του άγνωστου ορού είναι 1:10. Η ετικέτα του διαλύματος θετικού ελέγχου αναγράφει 160 μονάδες JDF

Υπολογισμός:

$$\text{ICAb συγκέντρωση} : \frac{10}{4} \times 160 = 400 \text{ μονάδες JDF}$$

Προετοιμασία των διαδοχικών αραιώσεων

Αριθμήστε τέσσερα σωληνάρια από το 1 έως το 4. Προσθέστε 0,4 ml διαλύματος αραιώσης δειγμάτων στο σωληνάριο 1 και 0,2 ml στα σωληνάρια 2 έως 4. Μεταφέρετε με πιπέτα 0,1 ml μη αραιωμένου ορού στο σωληνάριο 1 και αναμίξτε επιμελώς. Μεταφέρετε 0,2 ml από το σωληνάριο 1 στο σωληνάριο 2 και αναμίξτε επιμελώς. Συνεχίστε τη μεταφορά 0,2 ml από το ένα σωληνάριο στο επόμενο μετά από ανάμιξη, προκειμένου να επιτύχετε τις αραιώσεις που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Σωληνάρια	1	2	3	4
Ορός	0.1 ml			
	+			
Αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα	0.4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Μεταφορά		↗	↗	↗
Τελική αραιώση	1:5	1:10	1:20	1:40 κλπ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τόσο ένα διάλυμα θετικού όσο και ένα διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου θα πρέπει να μην παρουσιάζει ειδικό φθορισμό των κυττάρων των νησιδίων, ενώ το διάλυμα θετικού ελέγχου θα πρέπει να παρουσιάζει φθορισμό στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων των νησιδίων.

Εάν δεν λάβετε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, θα πρέπει να επαναλάβετε την ανάλυση. Εάν συνεχίζουν να εμφανίζονται ανεπαρκή αποτελέσματα με τα διαλύματα ελέγχου, αυτά ενδέχεται να οφείλονται σε:

- Θολερότητα. Απορρίψτε το διάλυμα ελέγχου και χρησιμοποιήστε ένα άλλο.
- Προβλήματα με το οπτικό σύστημα του μικροσκοπίου φθορισμού. Σε αυτά ενδέχεται να συμπεριλαμβάνονται: ακατάλληλη ευθυγράμμιση, παρέλευση της ωφέλιμης διάρκειας ζωής της λυχνίας, κλπ.
- Αποξήρανση της αντικειμενοφόρου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων για τα αντισώματα κατά των κυττάρων των νησιδίων θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά (<5) ή ως θετικά με τίτλο ή σε μονάδες JDF.

Εξετάστε για ειδική χρώση του κυτταροπλάσματος των νησιδίων του Langerhans. Διάφορα άλλα αντισώματα κατά ιστών, όπως είναι τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA), τα μιτοχονδριακά αντισώματα και τα αντισώματα κατά των λείων μυικών ινών ενδέχεται επίσης να παρατηρηθούν σε τομές παγκρέατος. Οροί που δίνουν οποιοσδήποτε από αυτές τις αντιδράσεις θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικοί για τα αντισώματα κατά των κυττάρων των

νησιδίων. Τυχόν οροί που δίνουν αντιδράσεις χρώσης του πυρήνα μπορούν να ελεγχθούν σε κύτταρα HEp-2 ή σε τομές ήπατος ποντικού. Τυχόν οροί που δίνουν αντιδράσεις χρώσης λείων μυικών ινών ή μιτοχονδρίων μπορούν να ελεγχθούν σε τομές νεφρού/στομάχου ποντικού. Βλέπε τη θετική για ICAb αντίδραση στη φωτογραφία 1 στο τέλος αυτού του εντύπου. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Οι αντιδράσεις ICAb είναι, από τη φύση τους, πολύ ασθενέστερες από τις αντιδράσεις για ANA ή από τις περισσότερες άλλες αντιδράσεις αντισωμάτων ανοσοφθορισμού.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Περιστασιακά οι οροί ενδέχεται να εμφανίσουν έντονη χρώση για ANA ή για άλλα αυτοαντισώματα. Τα αντισώματα αυτά ενδέχεται να επηρεάσουν την ικανότητα ανίχνευσης αντισωμάτων κατά των κυττάρων των νησιδίων. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η τιτλοδότηση του ορού ενδέχεται να επιτρέψει την απεικόνιση των αντισωμάτων κατά των κυττάρων των νησιδίων. Σε άλλες περιπτώσεις, ο τίτλος τους ενδέχεται να είναι χαμηλότερος από αυτόν των ANA ή άλλων αντισωμάτων και επομένως να μην είναι δυνατόν να ανιχνευθούν.

Η ανάλυση αντισωμάτων κατά των κυττάρων των νησιδίων ImmuGlo™ δεν θα πρέπει να εκτελείται σε δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, σε μολυσμένα από μικρόβια ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για την εξέταση δειγμάτων ορού ανθρώπου.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Περίπου το 50-80% των διαβητικών που εμφανίζουν για πρώτη φορά εκδήλωση της νόσου είναι θετικοί για αντισώματα κατά των κυττάρων των νησιδίων. Η συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων κατά των κυττάρων των νησιδίων σε μη διαβητικούς συγγενείς πρώτου βαθμού και σε μη διαβητικά φυσιολογικά άτομα έχει αναφερθεί ότι είναι 2-5% και 0,25-1,7%, αντίστοιχα. Περίπου το 11% των θετικών για αντισώματα κατά των κυττάρων των νησιδίων συγγενών πρώτου βαθμού αναπτύσσουν διαβήτη κάθε χρόνο. Έχουν αναφερθεί μεσοδιαστήματα διάρκειας έως και 8 ετών ανάμεσα στην ανίχνευση των αντισωμάτων κατά των κυττάρων των νησιδίων και στην εκδήλωση διαβήτη. Βλ. τη συχνότητα εμφάνισης των ICAb στον πίνακα 1 στο τέλος αυτού του εντύπου.

SISTEMA DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI ISLOTES DE LANGERHANS (ICAb)

IVD

PROSPECTO

REF 1123 ICA (páncreas de mono) 40 análisis

USO PREVISTO

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta para la detección y cuantificación de anticuerpos anti islotes de Langerhans en suero humano, como herramienta en el diagnóstico de la *diabetes melitus insulino-dependiente* (DMID).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica y compleja en la que influyen factores hereditarios y ambientales y cuya consecuencia es la incapacidad del organismo de mantener los carbohidratos, grasas y proteínas. La enfermedad destaca por altos niveles de glucosa en sangre y reconoce su causa en una deficiencia en la producción de insulina o en incapacidad de utilizar la insulina. La mayoría de los casos de diabetes puede agruparse en dos categorías clínicas: diabetes melitus insulino-dependiente (DMID o diabetes de tipo I) y diabetes melitus no insulino-dependiente (DMNID o diabetes de tipo II). La evolución, el tratamiento y control de la enfermedad son diferentes para cada uno de esos tipos. Está comúnmente aceptado que la DMID es una patología autoinmune dirigida contra las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans. La respuesta autoinmune a los antígenos de las células de los islotes suscita la respuesta de anticuerpos contra antígenos tales como ácido glutámico decarboxilasa (GAD), ICA-512 e insulina, que han demostrado ser importantes marcadores predictivos, especialmente si están presentes con título alto¹⁻¹⁵. La detección de estos ICAb mediante inmunofluorescencia indirecta (IF) en sustrato pancreático se considera el patrón de referencia para diagnosticar la DMID^{16,17}. Estos ICAb citoplasmáticos se utilizan habitualmente para predecir diabetes de tipo I¹⁸⁻²⁰. Los ICAb están presentes en hasta el 90% de los pacientes a quienes se diagnostica diabetes por primera vez. Según el estudio de familiaridad Bart's-Windsor, el 100% de los familiares de primer grado de pacientes afectados de DMID con >80 de unidades JDF de ICAb evolucionaron hacia la DMID dentro de los sucesivos 10 años. El nivel de ICAb es más alto antes de que se manifieste la diabetes de tipo I y disminuye paulatinamente después^{12,18}. Los ICAb tienen diferentes especificidades y presentan dos patrones de reacción principales⁴. El primero de esos patrones está restringido principalmente a las células beta. El segundo tinte todas las células dentro del islote y es el patrón de coloración clásico de los ICAb citoplasmáticos.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los anticuerpos anti islotes se detectan mediante inmunofluorescencia indirecta (IF). El suero del paciente se incuba en cortes de páncreas de mono para la unión de los anticuerpos al tejido sustrato. Los anticuerpos que no hayan reaccionado se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos ligados de clase IgG se detectan incubando estos cortes con conjugados marcados con fluoresceína. La reacción se observa en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. *La presencia de anticuerpos anti islotes es revelada por una fluorescencia de color verde manzana en el citoplasma de los islotes de Langerhans.* Los títulos (el recíproco de la mayor dilución que provocó una reacción positiva) se determinan analizando las diluciones seriadas del control positivo²¹.

DATOS DEL PRODUCTO

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. Los reactivos están listos para su uso tan pronto como alcanzan la temperatura ambiente.

Material suministrado

ICAb páncreas de mono ImmuGlo™ **REF** 1123

El kit contiene reactivos suficientes para efectuar 48 análisis.

ES

10 x

SORB	SLD	4
------	-----	---

1 x 0,5 ml

CONTROL	+	ICA
---------	---	-----

1 x 0,5 ml

CONTROL	-
---------	---

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC	EB
----------	------	----

1 x 5 ml

CONJ	B
------	---

1 x 60 ml

BUF	ICA
-----	-----

2 viales

BUF	WASH
-----	------

1 x 5 ml

MOUNTING	MEDIUM
----------	--------

1 x 12

COVER	SLD
-------	-----

Componentes opcionales

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC
----------	------

1 x 1 ml

EVANS

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC	PA
----------	------	----

Portas de sustrato de páncreas de mono con 4 pocillos.

Control positivo para ICA. Suero humano con anticuerpos anti islotes estandarizado contra el suero de referencia positivo a JDF (Juvenile Diabetes Foundation).

Control negativo. Contiene suero humano.

Conjugado de IgG antihumana FITC con azul de Evans. Protéjase de la luz.

Conjugado B. Protéjase de la luz.

Diluyente de muestras ICA.

Tampón fosfato salino (PBS). Disolver cada vial hasta 1 litro.

Medio de montaje. No congelar.

Cubreobjetos.

REF 2100X. Conjugado de IgG antihumana con FITC. Protéjase de la luz.

REF 2510*. Contraste azul de Evans

REF 2099. Conjugado de IgG antihumana FITC Protéjase de la luz. La conjugación reduce al mínimo reacciones del fondo en tejidos del primate


Símbolos empleados en las etiquetas:

 Número de lote

 Número de catálogo

 Fecha de caducidad

 Temperatura de conservación


 Consulte las instrucciones de uso

 Para diagnóstico *in vitro*

 Fabricante

 Número de análisis

 Fecha de fabricación

 *Peligro. Puede provocar cáncer. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Pedir instrucciones especiales antes del uso. No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Guardar bajo llave. Eliminar el contenido/el recipiente de residuos.

Material necesario no incluido

- Microscopio de fluorescencia
- Micropipetas o pipetas Pasteur
- Pipetas serológicas
- Cubeta de tinción (p.ej. cubeta de Coplin)
- Tubos de ensayo pequeños (p.e. 13 x 75 mm) y gradilla para tubos

ES

- Agua destilada o desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco lavador
- Toallas de papel
- Cámara de incubación

ADVERTENCIAS

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo material de origen humano usado en la preparación de este producto se ha examinado con métodos aprobados por la FDA, y resultó negativo a anticuerpos contra HIV, HbsAg y HCV. Las muestras de suero humano y los productos de origen humana deben considerarse potencialmente peligrosos independientemente de su origen. Respétense las buenas prácticas de laboratorio al conservar, dispensar y eliminar tales materiales²².

ATENCIÓN: la azida de sodio (NaN_3) puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías y formar azidas metálicas altamente explosivas. Después de dispensar líquidos, se recomienda lavar con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas. La azida de sodio puede ser tóxica por ingestión; en caso de ingestión accidental, informe inmediatamente del hecho al director del laboratorio o a un centro de control de envenenamientos.

Siga estrictamente las instrucciones tal como se presentan en este prospecto para garantizar resultados válidos. No cambie los componentes del kit con otros de otras fuentes o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. No los utilice después de la fecha de caducidad.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Este procedimiento requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas con microbios. Conserve las muestras a 2-8°C por no más de una semana. Para una conservación más prolongada, congele el suero a -20°C. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO

Metodología del análisis

A. CONTROL

1. Diluya el suero del paciente en proporción 1:5 con el diluyente de muestras (0,1 ml de suero + 0,4 ml de diluyente) No diluya los controles positivo o negativo. Conserve el suero no diluido para determinar la titulación de anticuerpos si los análisis resultaran positivos.
2. Espere a que las bolsas con los portas de substrato se estabilicen a la temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraiga los portas cuidadosamente sin tocar el substrato.
3. Etiquete los portas y colóquelos en la cámara de incubación acondicionada con toallas de papel humedecidas para mantener las condiciones de humedad adecuadas.
4. Invierta el frasco gotero y aplique suavemente 1 gota (aproximadamente 50 μl) de control negativo en el pocillo #1. Del mismo modo, aplique 1 gota de control positivo en el pocillo #2. No llene demasiado los pocillos.
5. Con una micropipeta o pipeta Pasteur, coloque 1 gota de suero diluido del paciente (aproximadamente 50 μl) en los restantes pocillos. No llene demasiado los pocillos.
6. Coloque la tapa de la cámara de incubación; incube los portas durante 18-24 horas a 2-8°C.
7. Retire un porta de la cámara de incubación. Sosteniéndolo por un extremo, lávelo delicadamente con una pipeta y aproximadamente 10 ml de PBS, o bien en un recipiente lleno de PBS. No utilice frasco de lavado. Transfiera de inmediato el porta a una cubeta de Coplin y lávelo durante 10 minutos. Repita el procedimiento con los restantes portas.
8. Retire los portas de la cubeta de Coplin. Seque el borde de los portas con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Ponga los portas en la cámara de incubación. Acto seguido, con el frasco gotero de conjugado IgG FITC aplique 1 gota (aproximadamente 50 μl) en cada pocillo.

ES

9. Coloque la tapa en la cámara de incubación. Incube 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Repita los **pasos 7 a 9** para cada porta, utilizando el conjugado B en lugar del conjugado IgG FITC.
11. Extraiga un porta del incubador. Sosteniéndolo por un extremo, sumérjalo en un recipiente con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Ponga los portas en una cubeta de coloración llena de PBS durante 10 minutos. Si está usando el conjugado opcional sin contraste (véanse los componentes opcionales en el apartado "Material suministrado"), puede añadir 2-3 gotas de azul de Evans en el lavado final. NOTA: un lavado inadecuado podría aumentar la fluorescencia de fondo.
12. Retire un porta de la cubeta de coloración. Seque el borde con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. **Para evitar que el porta se seque, pase de inmediato a la fase sucesiva mientras el porta todavía está húmedo.**
13. Monte el cubre aplicando uniformemente en el mismo **3 gotas** de medio de montaje; ponga el cubre sobre el porta sin presionar demasiado y evitando que se desplace lateralmente.
14. Repita los pasos 12 y 13 para cada porta.
15. Examine la fluorescencia específica con microscopio de fluorescencia con aumento de 200x o más.

Los portas se han de leer tan pronto como estén listos. Sin embargo, gracias a la presencia de un agente antidecoloración en el medio de montaje, no se produce una disminución significativa en la intensidad de coloración aunque la lectura se postergue por 48 horas. Los portas deben conservarse en la oscuridad a una temperatura entre 2 y 8°C.

B. Determinación de punto final (titulación)

Un suero que resulte positivo en la fase de control puede ser analizado nuevamente siguiendo los pasos de 5 a 13 para determinar el título. Cada ciclo de análisis incluirá los controles positivo y negativo. Prepare diluciones seriadas y por duplicado a partir de 1:5. El recíproco de la mayor dilución que provoca una reacción positiva es la titulación.

Si el título del control positivo está dentro de los límites indicados en las especificaciones adjuntas de control de calidad, entonces los niveles del anticuerpo en el suero del paciente pueden indicarse en unidades JDF¹⁶. El valor del control positivo expresado en unidades JDF está impreso en la etiqueta del frasco. Para calcular el valor en unidades JDF de un suero no conocido, divida el título del suero desconocido por el título del control positivo y multiplique el resultado por las unidades JDF indicadas en la etiqueta del control positivo.

Ejemplo:

El título del control positivo es 1:4. El título de la muestra no conocida, 1:10. La etiqueta del control positivo indica 160 unidades JDF.

Cálculo:

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

Preparación de diluciones seriadas

Numere cuatro tubos de 1 a 4. Ponga 0,4 ml de diluyente de muestras en el número 1 y 0,2 ml en los tubos de 2 a 4. Pipetee 0,1 ml de suero sin diluir en el tubo 1 y mezcle bien. Transfiera 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezcle bien. Siga transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente después de mezclar hasta producir las diluciones indicadas 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
		↗	↗	↗
Transferir		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilución final	1:5	1:10	1:20	1:40 etc.

CONTROL DE CALIDAD

En cada ciclo de análisis se deben incluir un control positivo y un control negativo. El control negativo no debe evidenciar una fluorescencia específica de los islotes, mientras que el control positivo debe teñir el citoplasma de los islotes.

Si no se obtienen los resultados esperados, hay que repetir el análisis. Si se siguen obteniendo resultados inadecuados con los controles, puede deberse a:

- Turbidez. Descarte el control y utilice otro.
- Problemas en el sistema óptico del microscopio de fluorescencia tales como alineación incorrecta, lámpara que debe ser cambiada, etc.
- El porta se secó durante el proceso.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de los análisis de anticuerpos anti islotes deben considerarse negativos (<5) o positivos con título o unidades JDF⁸.

Lea la coloración específica del citoplasma de los islotes de Langerhans. En los cortes de páncreas también pueden observarse otros anticuerpos tisulares -antinucleares (ANA), antimitocondriales y anti músculo liso-. Los sueros que den una cualquiera de estas reacciones deben registrarse como negativos a anticuerpos anti islotes. Todo suero en que se adviertan reacciones de tinción nuclear debe analizarse en células HEP-2 o cortes de hígado de ratón. Todo suero que dé reacciones de tinción del músculo liso o del mitocondrio debe analizarse en cortes de riñón o estómago de ratón. La foto 1, al final de este documento, muestra una reacción positiva a ICAb.

NOTA: por su misma naturaleza, las reacciones ICAb son mucho más débiles que las de ANA o de la mayoría de otras reacciones de anticuerpos detectadas por inmunofluorescencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ocasionalmente, un suero podría presentar una fuerte tinción para ANA u otros autoanticuerpos; esto puede interferir con la capacidad de detectar anticuerpos anti islotes. En estos casos, titular el suero puede permitir la visualización de los anticuerpos anti islotes. En otros casos, su título puede ser inferior a los ANA u otros anticuerpos y por tanto no ser detectado. El ensayo ImmuGlo™ para detección de anticuerpos anti islotes no debe utilizarse en muestras muy hemolizadas, contaminadas con microbios o lipémicas. Esta técnica se ha de utilizar únicamente para analizar suero humano.

VALORES ESPERADOS

Entre el 50 y el 80% de los pacientes en que la diabetes se manifiesta por primera vez son positivos a anticuerpos anti islotes. Por su parte, se ha indicado en el 2-5% y 0,25-1,7% respectivamente la presencia de anticuerpos anti islotes en familiares de primer grado no diabéticos y en individuos normales no diabéticos⁵⁻¹⁶. Cada año, alrededor del 11% de los familiares de primer grado positivos a anticuerpos anti islotes desarrollan la diabetes. Se han señalado intervalos de hasta 8 años entre la detección de los anticuerpos anti islotes y la manifestación de la diabetes. Véase la incidencia de ICAb en la Tabla 1 al final de este documento.

TESTSYSTEM FÜR INSELZELLANTIKÖRPER (ICA)

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1123 ICA (Pankreas vom Primat) 40 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Indirekter Immunfluoreszenztest für den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von Inselzellantikörpern in Humanserum als Hilfsmittel bei der Diagnose von *insulinabhängiger Diabetes mellitus* (IDDM).

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Diabetes ist eine chronische und komplexe Krankheit, die von verschiedenen erblichen und umweltbedingten Faktoren beeinflusst wird, welche dazu führen, dass der Körper nicht in der Lage ist, die Verwertung von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen aufrechtzuerhalten. Die durch hohe Blutzuckerwerte gekennzeichnete Krankheit wird durch eine fehlende Insulinproduktion oder eine Beeinträchtigung der Insulinnutzung ausgelöst. Die meisten Fälle von Diabetes sind einer von zwei klinischen Kategorien zuzuordnen: *insulinabhängiger Diabetes mellitus* (IDDM oder Typ-I-Diabetes) und *nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus* (NIDDM oder Typ-II-Diabetes).

Die Prognose, Behandlung und Handhabung der Krankheit sind bei jedem Typ unterschiedlich. Es wird allgemein akzeptiert, dass IDDM eine Autoimmunkrankheit ist, die die β -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas angreift. Die Autoimmunreaktion auf Inselzellantigene führt zu Antikörperreaktionen gegen Antigene wie z.B. Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD), ICA-512 und Insulin. Diese wurden als äußerst prädiktive Marker identifiziert, insbesondere, wenn sie mit hohem Titer vorliegen¹⁻¹⁵. Der Nachweis dieser ICA mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF) auf Pankreassubstrat gilt als der Goldstandard für die Diagnose von IDDM^{16,17}. Diese zytoplasmatischen ICA werden derzeit für die Vorhersage von Typ-I-Diabetes verwendet¹⁸⁻²⁰.

ICA werden bei bis zu 90% von neu diagnostizierten Diabetespatienten nachgewiesen. In der Bart's-Windsor-Familienstudie erkrankten 100% der Verwandten ersten Grades von IDDM-Patienten, bei denen ICA-Werte >80 JDF-Einheiten vorlagen, innerhalb von 10 Jahren an IDDM. Der ICA-Spiegel scheint vor dem Ausbruch von Typ-I-Diabetes am höchsten zu sein und fällt danach fortschreitend ab^{12,18}. ICA weisen mehrere deutliche Spezifitäten und zwei hauptsächliche Reaktionsmuster auf⁴. Das erste Muster beschränkt sich überwiegend auf die β -Zellen. Das zweite färbt alle Zellen innerhalb der Insel und ist das klassische Färbemuster für zytoplasmatische ICA.

TESTPRINZIP

Inselzellantikörper werden mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF) nachgewiesen. Bei dieser Methode werden Patientenserum auf Schnitten von Affenpankreas inkubiert, um die Bindung der Antikörper an das Gewebesubstrat zu ermöglichen. Nicht gebundene Antikörper werden durch Spülen entfernt. Gebundene Antikörper der Klasse IgG werden durch Inkubieren dieser Schnitte mit Fluorescein-markiertem Konjugaten nachgewiesen. Die Reaktionen werden unter einem mit den entsprechenden Filtern versehenen Fluoreszenzmikroskop beobachtet. *Das Vorhandensein von Inselzellantikörpern wird durch eine apfelgrüne Fluoreszenz des Zytoplasmas der Langerhans-Inseln angezeigt.* Der Titer (der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die zu einer positiven Reaktion führt) wird anschließend durch das Testen von Verdünnungsreihen des positiven Kontrollserums bestimmt²¹.

INFORMATION

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, nachdem sie Raumtemperatur erreicht haben.

DE

Mitgelieferte Materialien

ImmuGlo™ Pankreas (Primat) **REF** 1123

Die Kits enthalten genügend Reagenzien, um je 40 Bestimmungen durchzuführen.

10 x	SORB SLD 4	Affenpankreassubstrat-Objekträger mit 4 Vertiefungen
1 x 0,5 ml	CONTROL + ICA	ICA-positives Kontrollserum. Humanserum mit Inselzellantikörpern, das gegen das positive Referenzserum der JDF (Juvenile Diabetes Foundation) genormt wurde. Die JDF-Einheiten sind auf dem Flaschenetikett angegeben.
1 x 0,5 ml	CONTROL -	Negatives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB	Anti-human-IgG-FITC-Konjugat mit Evans-Blau. Vor Licht schützen.
1 x 5 ml	CONJ B	Konjugat B. Vor Licht schützen.
1 x 60 ml	BUF ICA	Probenverdünner.
2 Fläschchen	BUF WASH	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). Jedes Fläschchen auf 1 Liter auffüllen.
1 x 5 ml	MOUNTING MEDIUM	Eindeckmittel. Nicht einfrieren.
1 x 12	COVER SLD	Deckgläserchen.

Optionale Bestandteile

1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC	REF 2100X - Anti-human-FITC-Konjugat. Vor Licht schützen.
1 x 1 ml	EVANS	REF 2510* - Evans-Blau-Gegenfärbung.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC PA	REF 2099 - Anti-human-IgG-FITC-Konjugat. Vor Licht schützen. Verringert Hintergrundfluoreszenz auf Primatsubstrat.

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

LOT Chargennummer

REF Bestellnummer

 Verwendbar bis

 Lagertemperatur


 Finden Sie Anweisungen für die

IVD Verwendung

 In-vitro-Diagnostikum Hersteller

 Anzahl an Tests

 Herstellungsdatum

 *Gefahr. Kann Krebs erzeugen. Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Unter Verschluss aufbewahren. Unter Verschluss aufbewahren. Inhalt/ Behälter im genehmigten Abfallbeseitigung entsorgenGH-Einstufung.

DE

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Fluoreszenzmikroskop
- Mikropipette oder Pasteurpipette
- Serologische Pipetten
- Färbekasten (z.B. Coplin-Färbetrog)
- Kleine Probenröhrchen (z.B. 13 x 75 mm) und Röhrchenhalter
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- 1-Liter-Behälter
- Waschflasche
- Papiertücher
- Inkubationskammer

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Alle menschlichen Serumproben und Produkte menschlichen Ursprungs sollten unabhängig von ihrer Herkunft als potentiell gefährlich behandelt werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis²².

WARNUNG – Natriumazid (NaN_3) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in dieser Kitbeilage dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen.

Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer. Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben bei -20°C eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Testmethode

A. Suchtest

1. Verdünnen Sie jedes Patientenserum 1:5 mit dem mitgelieferten Probenverdünner (0,1 ml Serum + 0,4 ml Verdünner). Verdünnen Sie nicht die positiven und negativen Kontrollseren. Bewahren Sie die unverdünnten Seren auf, um die Antikörpertiter zu bestimmen, falls Suchtests positiv ausfallen.
2. Lassen Sie die Beutel mit den Substratobjektträgern 10-15 Minuten lang bei Raumtemperatur liegen. Entfernen Sie vorsichtig die Objektträger, ohne das Substrat zu berühren.
3. Kennzeichnen Sie die Objektträger und legen Sie sie in eine Inkubationskammer, die mit mit Wasser befeuchteten Papiertüchern ausgelegt ist, um das Austrocknen zu verhindern.
4. Drehen Sie das Tropffläschchen um und drücken Sie es vorsichtig, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) negatives Kontrollserum in Vertiefung 1 zu geben. Geben Sie auf gleiche Art 1 Tropfen positives Kontrollserum in Vertiefung 2. Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.

DE

5. Verwenden Sie einen Mikropipette oder Pasteurpipette, um jeweils 1 Tropfen (etwa 50 µl) des verdünnten Patientenserums in die übrigen Vertiefungen zu geben. Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.
6. Verschließen Sie die Inkubationskammer und inkubieren Sie die Objektträger 18-24 Stunden lang bei 2°-8°C.
7. Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und spülen Sie ihn vorsichtig mit einer Pipette mit etwa 10 ml PBS ab, oder spülen Sie den Objektträger in einem mit PBS gefüllten Becher. Verwenden Sie keine Waschflaschen. Geben Sie den Objektträger sofort in einen Coplin-Trog und waschen Sie ihn 10 Minuten lang. Wiederholen Sie diesen Vorgang mit allen anderen Objektträgern.
8. Entfernen Sie den/die Objektträger aus dem Coplin-Trog. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. Legen Sie den Objektträger in die Inkubationskammer. Drehen Sie sofort das Tropffläschchen mit dem IgG-FITC-Konjugat um und drücken Sie es vorsichtig, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) in jede Vertiefung zu geben.
9. Verschließen Sie die Inkubationskammer und inkubieren Sie die Objektträger 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
10. Wiederholen Sie Schritte **7 bis 9** für jeden Objektträger und verwenden Sie dabei Konjugat B anstelle des IgG-FITC-Konjugats.
11. Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und tauchen Sie ihn in einen Becher mit PBS, um das überschüssige Konjugat zu entfernen. Belassen Sie den/die Objektträger 10 Minuten lang in einem mit PBS gefüllten Färbekasten. Falls das optionale Konjugat ohne Gegenfärbung verwendet wird (siehe „Optionale Bestandteile“ im Abschnitt „Mitgelieferte Materialien“), können Sie der letzten Spülung 2-3 Tropfen Evans-Blau-Gegenfärbung hinzufügen. Wiederholen Sie den Vorgang mit den übrigen Objektträgern. ANMERKUNG: Unsachgemäßes Waschen kann zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führen.
12. Entfernen Sie einen Objektträger aus dem Färbekasten. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. Fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt fort, während der Objektträger noch nass ist, um dessen Austrocknen zu verhindern.
13. Bringen Sie das Deckgläschen an, indem Sie **3 Tropfen** Eindeckmittel gleichmäßig auf das Deckgläschen auftragen und dieses auf den Objektträger legen. Üben Sie keinen übermäßigen Druck aus und verhindern Sie eine seitliche Bewegung des Deckgläschens.
14. Wiederholen Sie Schritte 12 und 13 für jeden Objektträger.
15. Untersuchen Sie die Objektträger auf eine spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200-facher Vergrößerung

Die Objektträger können sofort nach ihrer Vorbereitung abgelesen werden. Da das Eindeckmittel jedoch ein Mittel gegen das Verbleichen enthält, tritt kein signifikanter Verlust der Farbinsintensität ein, wenn das Ablesen um bis zu 48 Stunden verzögert wird. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8 °C gelagert werden.

Endpunkt-Bestimmung (Titration)

Sie können ein im Suchtest positives Serum weiter testen, indem Sie Schritte 5 bis 13 befolgen, um den Titer zu bestimmen.

Bei jedem Testlauf sollten die positiven und negativen Kontrollseren mitverwendet werden. Stellen Sie beginnend mit 1:5 eine verdoppelnde Verdünnungsreihe her. Der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion hervorruft, entspricht dem Titer.

Wenn der Titer des positiven Kontrollserums innerhalb des in den beiliegenden QK-Spezifikationen definierten Bereichs fällt, kann der Antikörperspiegel des Patientenserums in JDF-Einheiten angegeben werden¹⁶. Der Wert in JDF-Einheiten des positiven Kontrollserums ist auf dem Flaschenetikett angegeben. Zur Berechnung des Werts in JDF-Einheiten des unbekanntes Serums teilen Sie einfach den Titer des unbekanntes Serums durch den Titer des positiven Kontrollserums und multiplizieren Sie das Ergebnis mit den auf dem Etikett des positiven Kontrollserums angegebenen JDF-Einheiten.

DE

Beispiel:

Der Titer des positiven Kontrollserums ist 1:4. Der Titer des unbekanntes Serums ist 1:10. Aus dem Etikett des positiven Kontrollserums sind 160 JDF-Einheiten angegeben.

Berechnung:

$$\text{ICA-Konzentration} : \frac{10}{4} \times 160 = 400 \text{ JDF-Einheiten}$$

Vorbereitung der Verdünnungsreihen

Nummerieren Sie vier Röhrrchen von 1 bis 4. Geben Sie 0,4 ml Probenverdünner in Röhrrchen 1 und je 0,2 ml in Röhrrchen 2 bis 4. Pipettieren Sie 0,1 ml unverdünntes Serum in Röhrrchen 1 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie 0,2 ml von Röhrrchen 1 in Röhrrchen 2 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie nach dem Mischen weiterhin jeweils 0,2 ml von einem Röhrrchen ins nächste, um die in der nachfolgenden Tabelle angezeigten Verdünnungen zu erhalten:

Röhrrchen	1	2	3	4
Serum	0.1 ml			
	+			
Gepufferter Verdünner	0.4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Übertragung		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Endverdünnung	1:5	1:10	1:20	1:40 usw.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl das positive als auch das negative Kontrollserum mitverwendet werden. Das negative Kontrollserum sollte keine spezifische Fluoreszenz der Inselzellen zeigen, während das positive Kontrollserum das Zytoplasma der Inselzellen färben sollte.

Falls die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten werden, sollte der Testlauf wiederholt werden. Falls mit den Kontrollseren weiterhin unzureichende Ergebnisse erzielt werden, kann dies folgende Ursachen haben:

- Trübung. Verwerfen Sie das Kontrollserum und verwenden Sie ein neues.
- Probleme mit dem optischen System des Fluoreszenzmikroskops. Dazu können zählen: falsche Ausrichtung, die Lampe hat ihre Nutzungsdauer überschritten, usw.
- Der Objektträger ist während des Verfahrens ausgetrocknet.

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse des Tests auf Inselzellantikörper sollten als negativ (<5) oder positiv mit Titer oder JDF-Einheiten angegeben werden⁸.

Achten Sie auf eine spezifische Färbung des Zytoplasmas der Langerhans-Inseln. Auf Pankreasschnitten können auch mehrere andere Gewebeantikörper, z.B. antinukleäre Antikörper (ANA), mitochondriale Antikörper und Antikörper gegen glatte Muskulatur, beobachtet werden. Seren, bei denen einen oder mehrere dieser Reaktionen auftreten, sollten als negativ für Inselzellantikörper angegeben werden. Seren mit nukleären Farbreaktionen können auf HEp-2-Zellen oder Mausleberschnitten getestet werden. Seren mit Farbreaktionen auf mitochondriale Antikörper oder Antikörper gegen glatte Muskulatur können auf Schnitten von Mausnieren/-magen getestet werden. Siehe die ICA-positive Reaktion in Foto 1 am Ende dieses Dokuments.

Anmerkung: ICA-Reaktionen sind von Natur aus schwächer als Reaktionen auf ANA oder die meisten anderen Immunfluoreszenz-Antikörperreaktionen.

DE

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Gelegentlich können Seren eine starke Färbung für ANA oder andere Autoantikörper zeigen. Diese können die Fähigkeit, Inselzellantikörper nachzuweisen, beeinträchtigen. In solchen Fällen kann eine Titrierung des Serums das Aufzeigen der Inselzellantikörper ermöglichen. In anderen Fällen kann ihr Titer niedriger als der Titer der ANA oder anderer Antikörper sein und ist daher möglicherweise nicht nachweisbar.

Der ImmuGlo™ Inselzellantikörper-Test sollte nicht an stark hämolysierten, mikrobiell verunreinigten oder lipämischen Proben durchgeführt werden. Diese Methode sollte nur verwendet werden, um menschliche Serumproben zu testen.

ERWARTETE WERTE

Etwa 50-80% von gerade erkrankten Diabetikern testen positiv auf Inselzellantikörper. Die Häufigkeit von Inselzellantikörpern bei nicht-diabetischen Verwandten ersten Grades und bei nicht-diabetischen normalen Testpersonen wurde als 2-5% bzw. 0,25-1,7% angegeben⁵⁻¹⁶. Jedes Jahr entwickeln etwa 11% der Inselzellantikörper-positiven Verwandten ersten Grades Diabetes. Es wurde über Zeitabstände von bis zu 8 Jahren zwischen dem Nachweis von Inselzellantikörpern und dem Ausbruch von Diabetes berichtet. Siehe die Häufigkeit von ICA in Tabelle 1 am Ende dieses Dokuments.

DETECTION DES ANTICORPS CELLULES DES ILOTS DE LANGHERANS (ICAb)

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1123 ICA (Pancréas de Primate) 40 Tests

Test par immunofluorescence indirecte pour la recherche et la détermination semi-quantitative des anticorps des cellules des îlots de Langerhans dans le sérum humain pour aider à diagnostiquer le diabète insulino-dépendant (Insulin Dependent Diabetes Mellitus – IDDM).

GENERALITES

Le diabète est une maladie métabolique chronique et complexe influencée par différents facteurs héréditaires et environnementaux qui résulte dans l'incapacité pour le corps humain à utiliser correctement les glucides, protéines et graisses. Cette condition, caractérisée par des niveaux de glucose dans le sang très élevés, est causée par une déficience dans la production d'insuline ou par une mauvaise utilisation de cette dernière. La plupart des cas de diabète sont repris dans deux grandes catégories cliniques : diabète insulino-dépendant (IDDM ou diabète de type I) et le non insulino-dépendant (NIDDM ou diabète de type II).

Les pronostics, le traitement et la gestion de la maladie sont différents pour chaque type de diabète. Il a été reconnu que le IDDM est une maladie auto-immunitaire visant les cellules β des îlots de Langerhans se trouvant dans le pancréas. La réponse auto-immunitaire aux antigènes des cellules des îlots met au jour des réponses d'anticorps aux antigènes tels que l'acide glutamique décarboxylase (GAD), le ICA-512 et l'insuline. On a découvert qu'ils étaient des indicateurs très importants, particulièrement si leur titre est élevé¹⁻¹⁵. La détection de ces ICAb par immunofluorescence indirecte (IF) sur un substrat de pancréas est considérée comme le standard pour le diagnostic du IDDM¹⁶⁻¹⁷. Ces ICAb cytoplasmiques sont couramment utilisés pour la détection du diabète de type I¹⁸⁻²⁰.

Les ICAb sont détectés chez plus de 90% des patients diabétiques nouvellement diagnostiqués. Dans l'étude de la famille Bart's-Windsor, 100% des parents de premier degré de patients souffrant d'IDDM présentant des ICAb > 80 unités JDF ont évolué en IDDM en 10 ans. Le niveau des ICAb est apparu plus élevé avant le développement du diabète de type I et diminue ensuite progressivement¹²⁻¹⁸. Les ICAb ont plusieurs particularités distinctes et montrent deux principaux types de conformation de réaction⁴. La première conformation est confinée principalement dans les cellules β . La seconde colore toutes les cellules de l'îlot, il s'agit de la conformation de coloration classique pour les ICAb cytoplasmiques.

PRINCIPES DE LA METHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce kit, le sérum du patient est incubé sur des substrats de pancréas de singe, ce qui permet la fixation des anticorps avec le substrat. Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué anti-IgG humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps de classe IgG fixés. Les réactions sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence verte du cytoplasme des îlots de Langerhans montre la présence d'anticorps des cellules des îlots. Le titre du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé par dilutions sériques successives 21.

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 atteignent l'équilibre à la température ambiante du laboratoire.

Matériel fourni

ImmuGlo™ ICA Pancréas de Primate **REF** 1123

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 40 tests chacun.

FR

10 x	SORB SLD 4
1 x 0.5 ml	CONTROL + ICA
1 x 0.5 ml	CONTROL -
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB
1 x 5 ml	CONJ B
1 x 60 ml	BUF ICA
2 flacons	BUF WASH
1 x 5 ml	MOUNTING MEDIUM
1 x 12	COVER SLD

Autres réactifs disponibles

1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC
1 x 1 ml	EVANS
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC PA

Lames 4 puits avec **substrat de pancréas de singe**

Contrôle positif ICA. Sérum humain contenant des anticorps des cellules des îlots, standardisés JDF (Juvenile Diabetes Foundation) sérum positif de référence. **Les unités JDF sont indiquées sur le flacon.**

Contrôle négatif, avec sérum humain.

Conjugué d'anticorps FITC pour l'IgG humain contenant du Bleu Evans. Conserver à l'abri de la lumière.

Conjugué B. Maintenir à l'abri de la lumière.

ICA diluant sérum.

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

Milieu de montage. Ne pas congeler.









Lamelles couvre-lames.

REF 2100X – Conjugué FITC anti-IgG hum. Maintenir à l'abri de la lumière.


REF 2510* - Contre colorant Bleu d'Evans.

REF 2099 - Conjugué d'anticorps FITC pour l'IgG humain Conserver à l'abri de la lumière. Le conjugué réduit au minimum des réactions de fond sur des tissus de primate

Symboles utilisés sur les étiquettes:

 LOT	Numéro de lot
 REF	Numéro de référence catalogue A
	utiliser avant
	Température de conservation
	Consulter les instructions d'emploi
 IVD	Pour usage diagnostique In vitro
	Fabricant
	Nombre de tests

 Date de fabrication

 *Danger. Peut provoquer le cancer. Se procurer les instructions avant utilisation. Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/ aerosols. EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage. Garder sous clef. Éliminer le contenu/réceptif dans l'élimination des déchets approuvée

Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Bac à coloration pour le lavage des lames (bac Coplin)
- Petits tubes (ex : 13 X 75 mm) et porte-tubes

FR

- Eau distillée ou déionisée
- Epruvette graduée 1l
- Flacon pour solution de lavage
- Serviettes en papier
- Chambre d'incubation

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

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 résulte non réactif aux antigènes 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'usage²².

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN_3). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit composants par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

MODE OPERATOIRE

A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:5 à l'aide du diluant échantillon fourni (0.1ml de sérum + 0.4ml de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des anticorps dans le cas où le dépistage serait positif.
2. Laisser les lames prendre la température du laboratoire pendant 10-15 minutes dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat
3. Numérotter les lames et les placer dans la chambre humidifiée avec des serviettes en papier mouillées pour éviter le dessèchement.
4. Retourner le flacon doseur et appuyer doucement pour déposer 1 goutte (environ 50µl) de Contrôle Négatif sur le puit n°1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif ANA sur le puit n°2. Eviter de déborder des puits.
5. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder des puits.
6. Replacer le couvercle sur la chambre et incuber les lames 18 à 24 heures à 2°-8°C.
7. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette contenant environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un becher 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 (les) lame(s) du bac de coloration. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. Déposer la lame dans la chambre d'incubation. Retourner les flacons doseurs de conjugué IgG FITC et déposer immédiatement 1 goutte (environ 50µl) dans chaque puit.
9. Replacer le couvercle sur la chambre d'incubation et incuber 30 minutes à température ambiante.
10. Répéter les étapes 7 à 9 avec chaque lame, en utilisant le conjugué B à la place du conjugué IgG FITC.
11. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, plonger la lame dans un becher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration rempli de PBS pendant 10 minutes. Si un supplément de conjugué sans contre-coloration est utilisé (voir composé en option dans la Section Matériel Fourni), 2-3 gouttes de contre-coloration bleue d'Evans peuvent être ajoutée au lavage final. Répéter les opérations avec toutes les lames. REMARQUE: Un lavage incorrect peut augmenter le bruit de fond de fluorescence.
12. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. **Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est encore humide.**
13. Déposer doucement 3 **gouttes** de milieu de montage dans chaque puits 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 entre 2 et 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 du contrôle positif se trouve parmi les limites définies dans les spécificités de QC incluses, le niveau des anticorps dans le sérum du patient peut être indiqué en unités JDF¹⁶. La valeur des unités JDF du contrôle positif est imprimée sur l'étiquette du flacon. Pour calculer la valeur de l'unité JDF du sérum à tester, il faut simplement diviser le titre du sérum par le titre du contrôle positif et le multiplier par les unités JDF du contrôle positif.

Exemple :

Le titre du contrôle positif est 1:4. Le titre du sérum à tester est 1:10. Sur l'étiquette du contrôle positif est indiqué 160 unités JDF.

Calcul :

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

Préparation des dilutions en série

Numéroter quatre tubes de 1 à 4. Ajouter 0.4 ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0.2 ml dans les tubes 2 à 4. Pipeter 0.1ml de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0.2 ml du tube 1 dans le tube suivant. Continuer à transférer 0.2 ml d'un tube à l'autre en mélangeant bien chaque tube pour arriver aux dilutions suivantes :

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.

CONTROLE DE QUALITE

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne doit pas donner d'image fluorescente des cellules îlots tandis que le contrôle positif doit donner une fluorescence du cytoplasme des cellules des îlots.

Dans le cas où les contrôles ne donneraient 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.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats des essais pour la recherche des anticorps cellules des îlots doivent être considérés négatifs (<5) ou bien positifs avec le titre ou les unités JDF[®].

Ne considérer que les champs comprenant une coloration spécifique des cytoplasmes des îlots de Langerhans. D'autres anticorps de tissus tels que les anticorps anti-nucléaires ANA, les anticorps anti-mitochondriaux et les anticorps anti-muscle lisse peuvent également être observés sur des parties de pancréas. Les sérums donnant ce type de réaction doivent être considérés négatifs pour les anticorps des cellules des îlots. Tout sérum produisant une réaction de coloration du noyau devrait être testés sur des cellules HEp-2 ou sur des parties de foie de souris. Tout sérum produisant une réaction de coloration des muscles lisses ou mitochondriale devrait être testé sur des parties de rein/estomac de souris. Voir réaction positive ICAb à la photo 1 à la fin de ce document.

REMARQUE : Les réactions ICAb sont, de par leur nature, bien plus faible que les réactions ANA ou la plupart des réactions d'anticorps par immunofluorescence.

LIMITES D'UTILISATION

Occasionnellement, les sérums peuvent présenter une coloration plus forte pour les ANA que pour les autres anticorps. Ceci peut interférer avec la détection des anticorps des cellules des îlots. Dans ce cas, le titrage du sérum peut permettre la visualisation des anticorps des cellules des îlots. Dans d'autres cas, leur titre peut être inférieur à celui des ANA ou d'autres anticorps et donc ils ne pourront pas être détectés.

ImmuGlo™ anti-cellules des îlots ne devrait pas être utilisé sur des sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne. Ce test est prévu pour tester des échantillons de sérum humain uniquement.

VALEURS PREVUES

Environ 50 à 80% des diabétiques nouvellement diagnostiqués sont positifs pour les anticorps des cellules des îlots. La prévalence des anticorps pour les cellules des îlots chez les parents de premier degré non diabétiques et chez les sujets normaux non diabétiques est respectivement de 2 à 5% et de 0.25 à 1.7%⁵⁻¹⁶. Chaque année, environ 11% des parents de premier degré positifs aux anticorps cellules d'îlots développent le diabète. Des intervalles de 8 ans entre la détection des anticorps cellules des îlots et le développement du diabète ont été reportés. Voir incidence ICAb dans le tableau 1 à la fin de ce document.

TEST PER ANTICORPI ANTI-CELLULE DELLE INSULE PANCREATICHE (ICAb)

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1123 ICA (Pancreas di scimmia) 40 determinazioni

FINALITA' D'USO

Test di immunofluorescenza indiretta per la rilevazione e semiquantificazione degli anticorpi anti-cellule delle insule pancreatiche nel siero umano come strumento di aiuto per la diagnosi del diabete mellito insulino-dipendente (IDDM).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il diabete è una malattia metabolica cronica e complessa influenzata da una serie di fattori ereditari e ambientali che causa l'incapacità dell'organismo di sostenere l'utilizzazione di carboidrati, grassi e proteine. Questa condizione, caratterizzata da elevati livelli glicemici, è il risultato di un deficit nella produzione di insulina o di un deterioramento nell'utilizzazione dell'insulina. La maggior parte dei casi di diabete rientrano in due categorie cliniche: il *diabete mellito insulino-dipendente* (IDDM o diabete Tipo I) e il *diabete mellito non insulino-dipendente* (NIDDM o diabete Tipo II). La prognosi, il trattamento e la gestione della malattia differiscono per ciascun tipo. È largamente accettato che il IDDM è una malattia autoimmune diretta contro le cellule β delle Isole di Langerhans nel pancreas. La risposta autoimmune agli antigeni delle cellule delle insule sollecita risposte anticorpali ad antigeni come l'acido glutamico decarbossilasi (GDA), l'ICA-512 e l'insulina, che sono stati identificati come marcatori altamente predittivi, particolarmente se presenti in titoli elevati¹⁻¹⁵. Il rilevamento di questi ICAb per immunofluorescenza indiretta (IF) su substrato pancreatico è ritenuto lo standard privilegiato per la diagnosi del IDDM^{16,17}. Gli ICAb citoplasmatici sono utilizzati correntemente come marcatore predittivo del diabete Tipo I¹⁸⁻²⁰. Gli ICAb vengono individuati nel 90% dei pazienti diagnosticati di diabete per la prima volta. Nello studio delle famiglie condotto da Bart-Windsor, il 100% dei parenti di primo grado dei pazienti IDDM con ICAb >80 unità JDF hanno progredito verso il IDDM in 10 anni. Il livello degli ICAb sembra essere al suo massimo ancora prima dell'esordio del diabete Tipo I, diminuendo progressivamente da quel momento in poi^{12,18}. Gli ICAb hanno varie specificità distinte e mostrano due principali pattern di reattività⁴. Il primo pattern è circoscritto primariamente alle cellule β, il secondo colora tutte le cellule presenti nelle insule ed è il pattern di colorazione classico per gli ICAb citoplasmatici.

PRINCIPI DELLE METODICHE

Gli anticorpi anti-cellule delle insule pancreatiche sono rilevati per immunofluorescenza indiretta (IF). In questo metodo, i sieri dei pazienti sono incubati su sezioni di pancreas di scimmia per consentire il legame degli anticorpi al substrato tissutale. Gli anticorpi non legati sono rimossi mediante lavaggio e quelli legati, di classe IgG sono individuati per incubazione del substrato con coniugato marcato con fluoresceina. Le reazioni si osservano per microscopia in fluorescenza usando filtri idonei.

La presenza degli anticorpi anti-cellule delle insule pancreatiche è dimostrata da una fluorescenza verde mela del citoplasma delle insule di Langerhans. I titoli (il valore reciproco della diluizione maggiore che produce una reazione positiva) sono poi determinati analizzando le diluizioni seriali²¹.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. È necessario, prima dell'uso, portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.

Materiali forniti

ICAb Pancreas di Scimmia ImmuGlo™ **REF** 1123

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 40 determinazioni ciascuno.

IT

10 x

SORB	SLD	4
------	-----	---

1 x 0.5 ml

CONTROL	+	ICA
---------	---	-----

1 x 0.5 ml

CONTROL	-
---------	---

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC	EB
----------	------	----

1 x 5 ml

CONJ	B
------	---

1 x 60 ml

BUF	ICA
-----	-----

2 fiale

BUF	WASH
-----	------

1 x 5 ml

MOUNTING	MEDIUM
----------	--------

1 x 12

COVER	SLD
-------	-----

Componenti opzionali

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC
----------	------

1 x 1 ml

EVANS

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC	PA
----------	------	----

Vetrini da 4 pozzetti, **Substrato Pancreas di Scimmia**

Controllo Positivo ICA. Siero umano contenente anticorpi anti-cellule delle insule pancreatiche, standardizzato contro il siero di riferimento positivo della JDF (Fondazione del Diabete Giovanile). **Le unità JDF sono indicate sull'etichetta del flacone.**

Controllo Negativo. Contiene siero umano.

Coniugato FITC anti-IgG umane con Blu di Evans. Proteggere dalla luce.

Coniugato B. Proteggere dalla luce.

Diluente Campione ICA

Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). Da ricostituire a 1 litro.

Liquido di montaggio. Non congelare.

Vetrini coprioggetto.

REF 2100X - Coniugato FITC anti-IgG umane. Proteggere dalla luce.

REF 2510* - Colorante di contrasto Blu di Evans.


REF 2099 - Coniugato FITC anti-IgG umane Proteggere dalla luce. Il coniugato minimizza le reazioni della priorità bassa sui tessuti del primate

Simboli usati sulle etichette:

 Numero di lotto

 Numero catalogo

 Scadenza

 Temperatura di conservazione


 Consultare le istruzioni per

 l'uso Uso diagnostico in vitro

 Produttore

 Numero di test

 Fabbricante

 *Pericolo. Può provocare il cancro. Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. Conservare sotto chiave. Smaltire il prodotto/ recipiente nello smaltimento dei rifiuti approvato.

Materiali necessari ma non forniti

- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta Pasteur
- Pipette sierologiche

IT

- Vaschetta per colorazione (ad es. vaschetta Coplin)
- Provette piccole per test (ad es. 13 x 75 mm) e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro.
- Flacone di lavaggio
- Salviette di carta
- Camera umida per l'incubazione

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia i derivati del sangue umano e i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali²².

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN_3) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni. Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

Per questa procedura usare unicamente campioni di siero. I campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati a -20°C. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

PROCEDURA

Metodo del test

A. Screening

1. Diluire il siero del paziente 1:5 con il Diluente ICA per Campioni fornito (0,1 ml di siero + 0,4 ml di diluente). Non diluire i Controlli Positivi o Negativi. Conservare il siero non diluito per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che le buste contenenti i vetrini raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti. Rimuovere con attenzione il vetrino senza venire in contatto con il substrato.
3. Contrassegnare i vetrini e disporli nella camera umida sul cui piano interno saranno state poste delle salviette di carta inumidite con acqua per prevenire l'essiccazione.
4. Applicare 1 goccia (circa 50 μl) di Controllo Negativo nel pozzetto #1. Allo stesso modo applicare 1 goccia di Controllo Positivo nel pozzetto #2. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Usando una micropipetta o pipetta Pasteur, applicare 1 goccia di siero diluito del paziente (circa 50 μl) negli altri pozzetti. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
6. Posizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per 18 - 24 ore a 2°-8°C.
7. Rimuovere il vetrino dalla camera umida. reggerlo per l'estremità e irrorare delicatamente con circa 10 ml di PBS usando una pipetta, oppure sciacquare il vetrino in un recipiente contenente PBS. Non usare flaconi di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino in una vaschetta Coplin di lavaggio e attendere per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.

8. Rimuovere il/i vetrino/i dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. Posizionare il vetrino nella camera umida. Applicare immediatamente 1 goccia (circa 50 µl) di Coniugato FITC IgG in ciascun pozzetto.
9. Posizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
10. Ripetere le fasi da **7 a 9** per ciascun vetrino, utilizzando il Coniugato B al posto del Coniugato FITC IgG.
11. Rimuovere il vetrino dalla camera umida, reggerlo per l'estremità e immergerlo in un recipiente contenente PBS per rimuovere il coniugato in eccesso. Lasciare il/i vetrino/i per 10 minuti in una vaschetta Coplin riempita con PBS. Nel caso venga usato un coniugato opzionale, privo di colorante di contrasto (vedere componenti opzionali nella sezione Materiali Forniti), possono essere aggiunte 2-3 gocce di Blu di Evans nel lavaggio finale. Ripetere la procedura per i restanti vetrini. NOTA: Un lavaggio inadeguato può causare un aumento nella fluorescenza di fondo.
12. Rimuovere il vetrino dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. **Per prevenire l'essiccazione, procedere immediatamente alla fase successiva mentre il vetrino è ancora umido.**
13. Montare il vetrino coprioggetto applicando **3 gocce** di liquido di montaggio uniformemente sul coprioggetto e posizionarlo sopra il vetrino. Evitare di esercitare una pressione eccessiva e gli spostamenti laterali del vetrino coprioggetto.
14. Ripetere le fasi **12 e 13** per ciascun vetrino.
15. Esaminare la fluorescenza specifica mediante microscopia a fluorescenza con ingrandimento 200x o superiore.

I vetrini possono essere letti appena montati. Tuttavia, per la presenza di un agente antiscolorimento nel liquido di montaggio, non si verificano perdite significative di intensità di colorazione e la lettura può essere effettuata nelle 48 ore successive alla preparazione. I vetrini devono essere conservati in assenza di luce a 2-8°C.

B. Determinazione Endpoint (titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere analizzato ulteriormente ripetendo le fasi da 5 a 13 per determinare il titolo anticorpale. Ogni serie di test deve includere Controlli Positivi e Negativi. Preparare diluizioni seriali a partire da 1:5. Il reciproco del valore della più alta diluizione a cui il campione mostra positività è il valore del titolo. Se il titolo del Controllo Positivo rientra nei limiti definiti dalle specifiche CQ incluse, i livelli dell'anticorpo presenti nel siero del paziente può essere riportato in unità JDF¹⁶. Il valore del Controllo Positivo in unità JDF è stampato sull'etichetta del flacone. Per calcolare il valore in unità JDF del siero sconosciuto, dividere il titolo del campione sconosciuto per il titolo del Controllo Positivo e moltiplicare questo valore per le unità JDF presenti sull'etichetta del Controllo Positivo,

Esempio:

Il titolo del Controllo Positivo è 1:4. Il titolo del Campione Sconosciuto è 1:10. Il valore sull'etichetta del Controllo Positivo è 160 unità JDF.

Calcolo:

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

Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare 4 provette da 1 a 4. Aggiungere 0,4 ml di Diluente del Campione nella provetta 1 e 0,2 ml nelle provette da 2 a 4. Pipettare 0,1 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 alla successiva, dopo la miscelazione, per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

Provette	1	2	3	4
Siero	0.1 ml			
	+			
Diluyente Tamponato	0.4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↗	↗	↗
Trasferimento		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluzione Finale	1:5	1:10	1:20	1:40 etc.

CONTROLLO DI QUALITÀ

In ogni serie di test dovrebbero essere inclusi un Controllo Positivo e un Controllo Negativo. Il Controllo Negativo non dovrebbe evidenziare fluorescenza specifica delle cellule delle insule, mentre il Controllo Positivo dovrebbe colorare il citoplasma delle cellule delle insule. Se non si ottengono i risultati attesi, la procedura dovrebbe essere ripetuta. Se i controlli continuano a produrre risultati discordanti, ciò può essere dovuto a:

- Torbidità. Smaltire e usare un nuovo controllo.
- Problemi legati al sistema ottico del microscopio a fluorescenza: allineamento non idoneo, lampada oltre la durata utile prevista, ecc.
- Aver lasciato asciugare il vetrino durante la procedura.

RISULTATI

I risultati dei test per gli anticorpi anti-cellule delle insule pancreatiche dovrebbero essere riportati come negativi con titolo inferiore a 5 o positivi con relativo titolo o unità JDF⁸. Leggere per la colorazione specifica del citoplasma delle insule di Langerhans. Vari altri anticorpi tissutali come gli anticorpi anti-nucleari (ANA), gli anticorpi anti-mitochondriali e gli anticorpi anti-muscolo liscio possono essere osservati anche su sezioni di pancreas. I sieri che producono questi tipi di reazioni devono essere riportati come negativi per gli anticorpi anti-cellule delle insule pancreatiche. Qualsiasi siero che produce reazioni di colorazione nucleare può essere testato su cellule epiteliali HEp-2 o su sezioni di fegato di topo. Qualsiasi siero che produce reazioni di colorazione del muscolo liscio o del mitocondrio deve essere testato su sezioni di rene/stomaco di topo. Vedere le reazioni positive agli ICAb in foto 1 alla fine di questo foglio.

NOTA: Le reazioni ICAb sono, per la loro natura, molto più deboli delle reazioni ANA o della maggior parte delle reazioni anticorpali per immunofluorescenza,

LIMITAZIONI DEL TEST

Occasionalmente, i sieri mostrano una forte colorazione per gli ANA e per altri anticorpi potendo interferire con la rilevazione degli anticorpi anti-cellule delle insule pancreatiche. In questi casi, si può ricorrere alla titolazione del siero per visualizzare gli anticorpi anti-cellule delle insule. In altri casi, il titolo può essere inferiore a quello degli ANA o degli altri anticorpi producendo una mancata rilevazione degli anticorpi ICA. Il Test per gli Anticorpi Anti-cellule delle Insule Pancreatiche ImmGlo™ non deve essere eseguito su campioni fortemente emolizzati, microbiologicamente contaminati o lipemici. Questa metodica deve essere usata solo per testare campioni di siero umano.

VALORI ATTESI

Circa il 50-80% dei nuovi diabetici risulta positivo gli anticorpi anti-cellule delle insule pancreatiche. La prevalenza di questi anticorpi in parenti non diabetici di primo grado e in individui normali non diabetici⁵⁻¹⁶ è stata dimostrata essere rispettivamente del 2-5% e dello 0,25-1,7%. Circa l'11% dei parenti di primo grado, positivi agli anticorpi anti-cellule delle insule pancreatiche, sviluppa il diabete in un anno. Sono stati riportati intervalli fino a 8 anni tra il rilevamento degli anticorpi delle cellule delle insule e l'esordio del diabete. Vedere l'incidenza ICAb nella tabella 1 alla fine di questo foglio.

SISTEMA DE ANÁLISE PARA ANTICORPOS ANTI-CÉLULAS DOS ILHÉUS (ICAb)

IVD

FOLHETO EXPLICATIVO

REF 1123 ICA (Pâncreas de Primata) 40 Determinações

APLICAÇÃO

Teste de imunofluorescência indirecta para a detecção e semiquantificação de anticorpos anti-células dos ilhéus em soro humano para auxiliar no diagnóstico de *diabetes mellitus insulino dependente* (DMID).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A diabetes é uma doença metabólica crónica complexa influenciada por vários factores hereditários e ambientais, que consiste na incapacidade do corpo de manter a utilização de carboidratos, gorduras e proteínas. Esta doença, caracterizada por níveis altos de glicose, é causada por uma deficiência na produção de insulina ou pela deterioração na utilização da insulina. A maior parte dos casos de diabetes pertence a duas categorias clínicas: *diabetes mellitus insulino dependente* (DMID ou diabetes Tipo I) e *diabetes mellitus não-insulino dependente* (DMNID ou diabetes Tipo II). O prognóstico, o tratamento e o controlo da doença são diferentes para cada tipo. É aceite que a DMID é uma doença auto-imune que visa as células β dos ilhéus de Langerhans no pâncreas. A resposta auto-imune aos antígenos das células dos ilhéus obtém respostas de anticorpos a antígenos como descarboxilação de ácidos glutâmicos (GAD), ICA-512 e insulina. Elas têm sido consideradas marcadores preditivos de alto nível, especialmente na presença de títulos altos¹⁻¹⁵. A detecção dessas ICAb através de imunofluorescência indirecta (IF) em substrato pancreático é considerada da mais alta qualidade para o diagnóstico de IDDM^{16,17}. Essas ICAb citoplasmáticas são usadas frequentemente para o diagnóstico de diabetes do tipo I¹⁸⁻²⁰. As ICAb são detectadas em até 90% dos doentes aos quais foi diagnosticada diabetes pela primeira vez. No estudo de famílias realizada por Bart-Windsor, 100% dos familiares de primeiro grau de doentes com DMID com unidades JDF de ICAb > 80 desenvolvem DMID dentro de 10 anos. O nível de ICAb parece ser mais alto antes do início da diabetes Tipo I e diminui progressivamente em seguida^{12,18}. ICAb têm muitas especificidades diferentes e revelam dois padrões mais importantes de reactividade⁴. O primeiro padrão limita-se predominantemente às células β . O segundo atinge todas as células dentro dos ilhéus e é o padrão clássico de coloração para as ICAb citoplasmáticas.

PRINCÍPIOS DO MÉTODO

Os anticorpos anti-células dos ilhéus são detectados por imunofluorescência indirecta (IF). Neste método, os soros dos doentes são incubados em secções de pâncreas de macaco para permitir a ligação de anticorpos com o substrato de tecido. Os anticorpos não ligados são eliminados com uma lavagem. Os anticorpos ligados da classe IgG são detectados com a incubação destas secções com conjugados marcados com fluoresceína. As reacções são observadas sob um microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados.

A presença de anticorpos anti-células dos ilhéus é revelada por uma fluorescência verde-maçã do citoplasma das células dos ilhéus de Langerhans.

O título (o equivalente da diluição mais alta com reacção positiva) é, então, determinado através da análise das diluições de soro²¹.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

Conservação e preparação

Conservar todos os reagentes à temperatura de 2 a 8 °C. Os reagentes estão prontos para usar após a estabilização à temperatura ambiente.

Materiais fornecidos

ImmuGlo™ ICA Pâncreas de Primata REF 1123

Cada kit contém uma quantidade de reagentes suficiente para 40 determinações.

PT

10 x

SORB	SLD	4
------	-----	---

1 x 0,5 ml

CONTROL	+	ICA
---------	---	-----

1 x 0,5 ml

CONTROL	-
---------	---

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC	EB
----------	------	----

1 x 5 ml

CONJ	B
------	---

1 x 60 ml

BUF	ICA
-----	-----

2 frascos

BUF	WASH
-----	------

1 x 5 ml

MOUNTING	MEDIUM
----------	--------

1 x 12 ml

COVER	SLD
-------	-----

Componentes opcionais

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC
----------	------

1 x 1,0 ml

EVANS

1 x 5 ml

IgG-CONJ	FITC	PA
----------	------	----

4 poços lâminas de substrato de rim de macaco

Controlo positivo ICA. Soro humano com anticorpos anti-células dos ilhéus, padronizados contra soro de referência positivo JDF (Juvenile Diabetes Foundation, Fundação da Diabetes Juvenil). **As unidades de JDF estão descritas no rótulo do frasco.**

Controlo negativo. Contém soro humano.

Conjugado de IgG anti-humana com FITC contendo azul de Evans. Proteger da luz.

Conjugado B. Proteger da luz.

ICA diluente de amostra

Soro fisiológico em tampão fosfato (PBS). Dissolver cada frasco em um litro.

Meio de montagem. Não congelar.

Lamela.

REF 2100X - Conjugado Anti-humano FITC. Proteger da luz.

REF 2510* - Concentração de azul Evan.

REF 2099 - Conjugado de IgG anti-humana com FITC Proteger da luz. O conjugado minimiza reações do fundo em tecidos do primata

Símbolos utilizados nos rótulos:

 Número de lote

 Número de catálogo

 Prazo de validade

 Temperatura de armazenamento


 Consulte as instruções de

 utilização Utilização em

 diagnóstico in vitro Fabricante

 Número de testes

 Data de fabricação

 *Perigo. Pode provocar cancro. Pedir instruções específicas antes da utilização. Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico. Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. Armazenar em local fechado à chave. Armazenar em local fechado à chave. Eliminar o conteúdo/recipiente em eliminação de resíduos aprovada.

Materiais necessários não fornecidos

- Microscópio de fluorescência
- Micropipetas ou pipeta de Pasteur

PT

- Pipetas serológicas
- Recipiente de coloração (por exemplo, frasco de Coplin)
- Pequenos tubos para teste (por exemplo, 13 x 75 mm) e suporte para tubos de teste
- Água destilada ou desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco de lavagem
- Toalhetes de papel
- Câmara de incubação

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Para ser usado no diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana usados foram testados para HbsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram resultado negativo nos testes requeridos pela FDA. Todas as amostras de soro humano e produtos obtidos a partir de seres humanos devem ser tratados como se fossem potencialmente perigosos, independente da sua origem. Observe boas práticas laboratoriais na conservação, preparação e eliminação desses materiais²².

ADVERTÊNCIA — A azida de sódio (NaN₃) pode reagir com a canalização de cobre e chumbo formando azidas altamente explosivas. Elimine os líquidos juntando água em abundância para evitar a formação de azida. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Em caso de ingestão acidental, informar imediatamente o responsável do laboratório ou o centro anti-venenos.

As instruções devem ser seguidas exactamente como indicadas no folheto do kit, para assegurar resultados válidos. Não misture componentes do kit com componentes de outras origens que não sejam do mesmo número de lote da Immco Diagnostics Inc. Não use o kit e seus componentes após a data de validade indicada no rótulo.

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Neste procedimento, só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou com contaminação microbiana podem interferir com o rendimento deste teste e, portanto, não devem ser utilizadas. Conserve as amostras por, no máximo, uma semana a 2-8 °C. Para conservar amostras de soro por mais tempo, é necessário congelá-las a -20 °C. Evite ciclos de congelação e descongelação repetidos das amostras.

PROCEDIMENTO

Método do teste

A. Análise

1. Dilua o soro de cada doente com a solução tampão fornecida na proporção de **1:5** (0,1 ml de soro + 0,4 ml de diluente). Não dilua os controlos positivos ou negativos. Conserve o soro não diluído para determinar títulos de anticorpos se as análises derem resultado positivo.
2. Deixe as bolsas contendo lâminas de substrato à temperatura ambiente por **10-15 min.**
3. Ponha a etiqueta nas lâminas e coloque-as numa câmara de incubação revestida com toalhetes de papel humedecidos com água para evitar a secura.
4. Inverter o frasco conta-gotas e apertar levemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl de controlo negativo) no poço n.º 1. Do mesmo modo, aplique 1 gota de controlo positivo na cavidade n.º 2. Evite encher demais os poços.
5. Servindo-se de uma micropipeta ou de uma pipeta de Pasteur, aplique **1 gota** de soro diluído do doente (aproximadamente 50 µl) nos outros poços. Evitar o enchimento excessivo dos poços.
6. Coloque a tampa na câmara de incubação e incube as lâminas por **18-24 h** à 2°-8°C.
7. Remova uma lâmina da câmara de incubação. Segure a lâmina pela extremidade da etiqueta e enxágue levemente com aproximadamente **10 ml** de PBS com o auxílio de uma pipeta, ou enxágue a lâmina numa

proveta cheia com PBS. Não utilize o frasco de lavagem. Transfira a lâmina imediatamente para o frasco de Coplin e lave por **10 min**. Repita o procedimento para todas as lâminas restantes.

8. Remova a(s) lâmina(s) do frasco de Coplin. Enxugue o bordo da lâmina com um toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS. Coloque a lâmina na câmara de incubação. Vire imediatamente o frasco contendo gotas de conjugado IgG FITC e aperte levemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) em cada poço.
9. Coloque a tampa na câmara de incubação e incube as lâminas por **30 min** à temperatura ambiente.
10. Repita as etapas de **7 a 9** com cada lâmina, utilizando o conjugado B no lugar do conjugado IgG FITC.
11. Retire uma lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina numa ponta e mergulhe-a num recipiente com PBS para eliminar o excesso de conjugado. Coloque a(s) lâmina(s) num recipiente de coloração com PBS durante 10 minutos. Se optar por usar conjugado sem contrastante (consultar componentes opcionais na secção Materiais fornecidos), poderá adicionar 2 a 3 gotas de contrastante azul de Evans à lavagem final. Repita nas lâminas restantes. NOTA: Uma lavagem deficiente pode levar a um aumento da fluorescência de fundo.
12. Remova uma lâmina do recipiente de coloração. Enxugue o bordo da lâmina com um toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS. **Para evitar que a lâmina seque, realize imediatamente a próxima etapa enquanto a lâmina ainda estiver molhada.**
13. Monte a lamela aplicando **3 gotas** de meio de montagem distribuídas a intervalos regulares sobre a lamela e coloque-a sobre a lâmina. Evite fazer pressão indevida e evite movimentos laterais da lamela.
14. Repita as etapas 12 e 13 com cada lâmina.
15. Examine a fluorescência específica num microscópio de fluorescência com um aumento de **200x** ou mais.

As lâminas devem ser lidas assim que estiverem prontas. Contudo, por causa da presença de um agente antidescoloração no meio de montagem não ocorrerá uma perda significativa de intensidade da coloração se a leitura for adiada até um máximo de 48 h. As lâminas devem ser conservadas no escuro a uma temperatura de 2–8 °C.

B: Determinação do ponto final (Titulação)

Um soro positivo na análise pode ser analisado outra vez seguindo as etapas de 5 a 13 para se determinar o título. Cada teste feito deve incluir os controlos positivo e negativo. Faça diluições de soro duplas, começando com 1:5. O equivalente da diluição maior a produzir uma reacção positiva é o título.

Se o título do controlo positivo estiver dentro dos limites definidos pelas especificações de CQ em anexo, os níveis de anticorpos no soro de um doente poderão ser apresentados em unidades JDF¹⁶. A unidade de valor JDF do controlo positivo está impressa no rótulo da ampola. Para calcular a unidade de valor JDF do soro desconhecido, divida simplesmente o título do desconhecido pelo título do controlo positivo e multiplique o resultado pelas unidades JDF no rótulo do controlo positivo.

Exemplo:

O título do controlo positivo é 1:4. O título da amostra desconhecida é 1:10. O rótulo do controlo positivo indica 160 unidades JDF.

Cálculo:

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

Preparação das diluições em série

Numere quatro tubos de 1 a 4. Adicione 0,4 ml de solução tampão ao tubo 1 e 0,2 ml aos tubos 2 a 6. Pipete 0,1 ml de soro não diluído para o tubo 1 e misture completamente. Transfira 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e misture completamente. Continue a transferir 0,2 ml de um tubo para o seguinte após misturar para produzir as diluições enumeradas na tabela abaixo:

PT

Tubos	1	2	3	4
Soro	0.1 ml			
	+			
Diluyente Tampão	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 DE QUALIDADE

Ambos os controlos, positivo e negativo, devem ser incluídos em cada teste realizado. O controlo negativo não deve mostrar fluorescência específica das células dos ilhéus, enquanto o controlo positivo deve corar o citoplasma destas células. Se não forem obtidos os resultados esperados, o procedimento deve ser repetido. Se continuarem a ocorrer resultados inadequados com os controlos, isso pode ser devido a:

- Turvação. Descartar e usar outro controlo.
- Problemas com o sistema óptico do microscópio de fluorescência. Podem incluir: alinhamento impróprio, uso da lâmpada para além da vida útil da mesma, etc.
- Permitir que a lâmina seque durante o procedimento.

RESULTADOS

Os resultados dos testes para anticorpos anti-células dos ilhéus devem ser registados como negativos (< 5) ou positivos com título ou unidades JDF . Leitura para coloração específica do citoplasma das células dos ilhéus de Langerhans. Vários outros anticorpos de tecidos como os anticorpos anti-nucleares (ANA), anticorpos anti-mitochondriais e anticorpos anti-músculo liso também podem ser observados nas secções de pâncreas. Os soros que apresentam uma destas reacções devem ser registados como negativos a anticorpos anti-células dos ilhéus. Todos os soros com reacções de coloração nuclear devem ser analisados com células HEP-2 ou com secções de fígado de murganho. Todos os soros com reacções para o músculo liso ou coloração mitocondrial devem ser analisados com rim/secções de estômago de murganho. Veja a reacção positiva a ICAb na fotografia 1 no final deste documento.

NOTA: as reacções ICAb são, por sua natureza, muito mais fracas do que as reacções a ANA ou do que muitas outras reacções de anticorpos de imunofluorescência.

LIMITES DO PROCEDIMENTO

Ocasionalmente, os soros podem apresentar uma coloração forte com ANA ou outros auto-anticorpos. Isto pode interferir com a capacidade de detectar anticorpos anti-células dos ilhéus. Nestes casos, a titulação do soro pode permitir a visualização dos anticorpos anti-células dos ilhéus. Em outros casos, o título dos soros pode ser mais baixo do que os títulos de ANA ou de outros anticorpos e, portanto, pode não ser detectado. O teste de anticorpos anti-células dos ilhéus ImmuGlo™ não deve ser realizado com amostras lipémicas, com contaminação microbiana ou muito hemolisadas. Este método deve ser utilizado somente para análises de amostras de soro humano.

VALORES ESPERADOS

Aproximadamente 50-80% dos novos diabéticos iniciais são positivos em relação aos anticorpos anti-células dos ilhéus. A prevalência de anticorpos anti-células dos ilhéus em familiares de primeiro grau não diabéticos e em indivíduos normais não diabéticos⁵⁻¹⁶ tem sido apontada como sendo de 2-5% e 0,25-1,7%, respectivamente. Por não, aproximadamente 11% dos familiares de primeiro grau positivos a anticorpos anti-células dos ilhéus desenvolvem diabetes. Têm sido relatados intervalos de 8 anos entre a detecção dos anticorpos anti-células dos ilhéus e o início da diabetes. Veja a incidência de ICAb na tabela 1 no final deste documento.

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J et al. N. 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 Å, 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, Grueneklee 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) 1999, 93-8395].

Photo 1. ICAb Staining Reaction

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

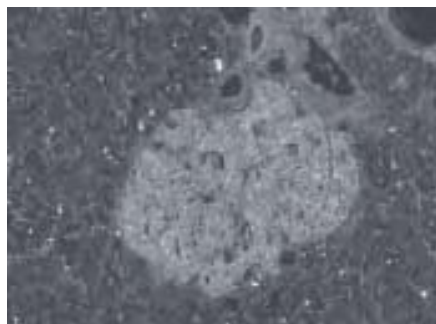


Table 1. Incidence of Anti-Islet Cell Antibodies

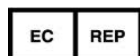
Disease Group	Age (years)	No. Patients examined	% Positive	
Type I Diabetes (IDDM)	at onset	<1-10	19	63
		11-20	25	60
		21-40	8	25
	long standing	<1-10	22	41
		11-20	71	39
		21-40	26	24
		41-70	13	0
	71-80	3	33	
Type II Diabetes (NIDDM)	at onset	<1-40	0	-
		41-80	39	3
	long standing	<1-10	0	-
		11-20	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, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120 USA
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands