



Instructions for Use

ICA ELISA (Islet Cell Autoantibodies)

IVD



REF EIA-1594

 96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
 Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
 Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos / Table des matières

1	INTRODUCTION AND INTENDED USE.....	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST.....	3
3	WARNING AND PRECAUTIONS.....	4
4	REAGENTS AND MATERIALS.....	4
5	ADDITIONAL MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED.....	5
6	SPECIMEN COLLECTION.....	5
7	REAGENT PREPARATION AND STORAGE.....	5
8	ASSAY PROCEDURE.....	6
9	CALCULATION OF DATA.....	7
10	QUALITY CONTROL.....	8
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
12	CLINICAL SIGNIFICANCE.....	8
13	LIMITATIONS AND SOURCES OF ERROR.....	8
1	EINFÜHRUNG UND VERWENDUNGSZWECK.....	9
2	TESTPRINZIP.....	9
3	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN.....	10
4	REAGENZIEEN UND MATERIALIEN.....	10
5	WEITERE ERFORDERLICHE, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN.....	11
6	PROBENGEWINNUNG.....	11
7	VORBEREITUNG DER REAGENZIEEN UND LAGERUNG.....	11
8	TESTVERFAHREN.....	12
9	TESTAUSWERTUNG.....	13
10	QUALITÄTSKONTROLLE.....	14
11	LEISTUNGSMERKMALE.....	14
12	KLINISCHE BEDEUTUNG.....	14
13	GRENZEN DES VERFAHRENS UND FEHLERQUELLEN.....	14
1	INTRODUZIONE E USO PREVISTO.....	15
2	PRINCIPIO DEL TEST.....	15
3	AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	16
4	REAGENTI E MATERIALI.....	16
5	ALTRI MATERIALI OCCORRENTI (NON IN DOTAZIONE).....	17
6	RACCOLTA DEL CAMPIONE.....	17
7	PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE.....	17
8	PROCEDURA DI ANALISI.....	18
9	CALCOLO DEI DATI.....	19
10	CONTROLLO QUALITÀ.....	20
11	CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA.....	20
12	SIGNIFICATO CLINICO.....	20
13	LIMITAZIONI E FONTI DI ERRORE.....	20

1	INTRODUCCIÓN Y USO PREVISTO	21
2	PRINCIPIO DEL TEST	21
3	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	22
4	REACTIVOS Y MATERIALES	22
5	MATERIALES ADICIONALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS	23
6	RECOPIACIÓN DE MUESTRAS	23
7	PREPARACIÓN REACTIVA Y ALMACENAMIENTO	23
8	PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	24
9	CÁLCULO DE DATOS	25
10	CONTROL DE CALIDAD	26
11	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO.....	26
12	TRASCENDENCIA CLÍNICA	26
13	LIMITACIONES Y FUENTES DE ERROR.....	26
1	INTRODUCTION ET APPLICATION.....	27
2	PRINCIPE DU TEST	27
3	AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	28
4	RÉACTIFS ET MATÉRIEL	28
5	AUTRE MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI.....	29
6	COLLECTE DE SPÉCIMENS	29
7	PRÉPARATION ET CONSERVATION DU RÉACTIF	29
8	PROCÉDURE DE DOSAGE	30
9	CALCUL DES DONNÉES	31
10	CONTRÔLE DE LA QUALITÉ.....	32
11	PERFORMANCES	32
12	IMPORTANCE CLINIQUE	32
13	LIMITES ET SOURCES D'ERREUR.....	32
14	LITERATURE.....	33
	SYMBOLS USED.....	34

1 INTRODUCTION AND INTENDED USE

Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) or Type I Diabetes is a debilitating chronic disease that impairs production and secretion of the key hormone insulin and alters blood sugar metabolism. Insulin is synthesized and secreted by pancreatic islet cells or Islets of Langerhans(1). The disruption of insulin synthesis is caused by immunological destruction of the islet cells by autoantibodies in IDDM patients(2-4). Such abnormalities (autoimmunity) may be genetically inherited and/or triggered by exposure to toxic chemicals, viral infections and various forms of stress(5).

IDDM has a characteristic asymptomatic prediabetic phase that may last up to several years. During this period, the affected individuals exhibit the diminishing early-phase release of insulin in response to an intravenous/oral glucose challenge. In the majority of cases, these individuals carry circulating islet cell autoantibodies (ICA) and/or insulin autoantibodies (IAA). ICA can be detected as early as eight years prior to the clinical onset of IDDM(6) and thus may serve as an early indicator of the disease or predisposition to it. Individuals who are ICA-positive may show a progressive loss of the islet cell function as indicated by disruption of the early-phase insulin release. When this early phase insulin release completely stops, clinically overt IDDM develops(6).

Islet Cell Autoantibodies are present in 70% of patients with a recent onset of IDDM (13,14) compared with 0.1 - 0.5% of the control non-diabetic population (11,15). ICA are also detected in first degree relatives of IDDM patients. These individuals comprise the segment of human population who are at a high risk of developing IDDM. Several studies reported that the ICA-positive first degree relatives of IDDM patients subsequently developed diabetes (16-19). Other studies also suggested that the presence of serum ICA and IAA is an indicator of the enhanced likelihood to develop IDDM (3,6-12). Therefore, serological detection of ICA may be a powerful tool for early diagnosis of IDDM. The significance of these autoantibodies as markers of IDDM is also illustrated by their presence in nondiabetic individuals who ultimately develop IDDM. Riley, et al. recently reported that determination of ICA in Type 2 Diabetes patients could identify IDDM prior to the onset of clinical symptoms and predict the need for insulin therapy (20). Thus, those patients who are initially diagnosed with Type 2 Diabetes and carry serum ICA may deteriorate to insulin dependence.

An early detection of circulating ICA is important in order to identify the individuals in the general population, the siblings and families of IDDM patients, who are at a higher risk of developing this disease because of their genetic predisposition to diabetes. At an international workshop on ICA, the imminent need for an ELISA test for the determination of islet cell autoimmunity was emphasized (21).

Currently, serum ICA are determined by indirect immuno-flourescence and histochemical methods employing frozen unfixed human/primate or rodent pancreatic sections as substrates. Despite various attempts to improve and modify this procedure since its original description in 1974 (22,23), the indirect immunoflourescence/histochemical technique suffers from inherent methodological problems. Standardization of the technique has proven to be very difficult. The reliability of this "frozen-section" technique is limited by factors such as the variation from one pancreas to another, the inevitable need for unfixed pancreatic tissue and infrequent availability of the suitable tissue.

DRG's Islet Cell Autoantibodies (ICA) ELISA is a qualitative ELISA test for in vitro detection of circulating IgG antibodies against pancreatic islet cell antigens.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

A purified mixture of pancreatic antigens is immobilized onto microwells. During an incubation period, antibodies in the serum sample are allowed to react at room temperature with antigen molecules on the microwells. After washing off excess/unbound serum materials, an enzyme (alkaline phosphatase) labeled goat antibody, specific to human IgG, is added to the antigen-antibody complex. After another thorough washing, a substrate (PNPP) is added and the color generated is measured spectrophotometrically. The intensity of the color is directly proportional to the concentration of ICA in the sample. An ICA-positive control serves as an internal quality control and ensures valid results.

3 WARNING AND PRECAUTIONS

All reagents provided with the kit are for in vitro diagnostic use only.

1. Potential Biohazardous Material

The matrix of the Calibrators and Controls is human serum. The human serum used has been found non-reactive to HbsAg, anti-HIV 1/2 and anti-HCV when tested with FDA licensed reagents. Because there is no test method that can offer complete assurance that HIV, Hepatitis B virus or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.

2. Sodium Azide

Some reagents contain sodium azide as a preservative. Sodium azide may react with lead, copper or brass to form explosive metal azides. When disposing of these materials, always flush with large volumes of water to prevent azide buildup.

3. Stop Solution

Stop Solution consists of 1N NaOH. This is a strong base and should be handled with caution. It can cause burns and should be handled with gloves. Wear eye protection and appropriate protective clothing. Avoid inhalation. Dilute a spill with water before absorbing the spill with paper towels.

4. Substrate Solution

Substrate Solution consists of para-Nitrophenylphosphate (PNPP), a non-proteinaceous chromogenic substrate used in this ELISA test. On occasion substrate may display a yellowish color. This color will not interfere with test results.

Precautions

1. Do not freeze test reagents, store all kit components at 2 °C - 8 °C at all times.
2. Positive and Negative Controls must be run each time the test is performed.
3. Use only clear serum as test specimens. The test sample should not have gross turbidity, hemolysis, or microbial contamination.
4. All samples should be analyzed in duplicate.
5. Do not mix reagents from different lots.
6. Do not use expired reagents.
7. Do not allow reagents to stand at room temperature for extended periods of time.
8. Do not expose substrate solution to light.
9. Careful pipetting technique is necessary for reproducible and accurate results.

4 REAGENTS AND MATERIALS

Materials Supplied:

1.	PLA ICA	Microwell Strips (with the holder)	12 strips
2.	CONJ ENZ 6X	IgG Enzyme Conjugate (6X conc.)	2 x 1.0 mL
3.	DIL SPE 5X	Sample Diluent (5X concentrate)	1 x 25.0 mL
4.	CONJ ENZ DIL	Conjugate Diluent	1 x 10.0 mL
5.	CTRL REF ICA	Reference Control	1 x 1.5 mL
6.	CTRL + ICA	Positive Control (human serum)	1 x 1.5 mL
7.	CTRL – ICA	Negative Control (human serum)	1 x 1.5 mL
8.	SUBS PNPP	Substrate Solution (PNPP)	1 x 15.0 mL
9.	BUF WASH 25X	Washing Buffer (25X concentrate)	1 x 20.0 mL
10.	SOLN STP	Stop Solution (1N NaOH)	1 x 6.0 mL

5 ADDITIONAL MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

1. Distilled or deionized water.
2. Absorbent paper towels to blot dry the strips after washing and parafilm/plastic wraps to cover strips during incubations.
3. Suitable sized glass tubes for serum dilution.
4. Micropipette with disposable tips to deliver 10 μ L, 50 μ L and 100 μ L.
5. A microtiter plate washer or a squeeze bottle for washing.
6. 5 mL pipettes for conjugate diluent delivery.
7. A 500 mL graduate cylinder.
8. Microtiter plate reader with 405 nm absorbance capability.
9. Plastic label tape, to tape unused wells before assay.

6 SPECIMEN COLLECTION

Collect 5 - 10 mL of blood by venipuncture into a clot (red top) tube. Serum separators may be used. Separate serum by centrifugation.

Serum samples may be stored at 2 °C - 8 °C.

Excessive hemolysis and the presence of large clots or microbial growth in the test specimen may interfere with the performance of the test.

Freeze the serum sample at -20 °C if it cannot be analyzed within 24 hours.

7 REAGENT PREPARATION AND STORAGE

1. IgG Enzyme Conjugate Reconstitution:

Accurately transfer 5 mL of the Conjugate Diluent into one bottle containing the IgG Enzyme Conjugate (concentrate). Close the bottle and mix thoroughly by inversions.

Store the diluted conjugate at 2 °C - 8 °C when not in use. Record the date of reconstitution on the label.

This diluted reagent expires 30 days after reconstitution.

Two bottles containing the conjugate concentrate are provided. Each bottle contains enough conjugate for 6 strips. Reconstitute as needed.

2. Sample Diluent Buffer:

If precipitate is present in the sample diluent buffer concentrate due to storage at lower temperature such as 2 °C - 8 °C, dissolve by placing the vial in a 37 °C water bath for 30 minutes.

Transfer the entire contents (25 mL) into 100 mL of distilled/deionized water in a suitable container.

Mix thoroughly; label the container as Sample Diluent, and store at 2 °C - 8 °C.

The diluted reagent is stable until the expiration shown on the vial.

Please note that the precipitate seen in the concentrate has no effect on the performance of the test and will not be present in the 1X working solution.

3. Wash Solution:

If crystals are present in the Wash Buffer concentrate due to storage at a lower temperature such as 2 °C - 8 °C, dissolve by placing the vial in a 37 °C water bath or incubator for 30 minutes.

Transfer the entire contents into 480 mL of distilled/deionized water in a 500 mL container. Mix thoroughly; label the container as Wash Solution, and store at 2 °C - 8 °C.

The diluted reagent is stable until the expiration shown on the vial.

4. Serum Sample Preparation:

Accurately pipet 10 μ L (0.010 mL) of serum sample into 1.0 mL of the Working Sample Diluent into an already labeled glass tube. Mix thoroughly.

8 ASSAY PROCEDURE

The test kit contains 12 microwell strips coated with purified islet cell antigens. The number of microwell strips used in each assay depends upon the number of serum samples to be tested. If 12 microwell strips are used, a total of 45 sample sera can be tested in duplicate with this kit.

IMPORTANT NOTE: Bring all the reagents, including serum samples, to room temperature (25 °C) before starting the assay. Incubation temperatures varying by greater than ± 1 °C can definitely affect results.

1. Assemble the number of microwell strips needed for the test in the holder provided. The microwell strip must be snapped in place firmly or it may fall out and break.
2. Familiarize yourself with the indexing system of wells, e.g. well #A1, B1, C1, D1, etc.
3. Dispense **100 μ L of Negative Control** into microwells C1 and D1.
4. Dispense **100 μ L of Positive Control** into microwells E1 and F1.
5. Dispense **100 μ L of Reference Control** into microwells G1 and H1
6. Add **100 μ L of diluted sample serum** (see #4, Section 7, Reagent Preparation) to microwells starting from A2 and B2. For more patient samples, use additional strips and add other diluted patient samples to microwells in duplicate. There should be 100 μ L of solution in each microwell to be assayed except A1 and B1 which are empty at this point and will be used later.
7. Any strips not used should be properly stored with desiccant in the ziplock bag provided for the next run. Any wells not used on the strip should be properly covered and saved for the next run.
8. Cover the plate with a parafilm/plastic wrap (to prevent contamination) and leave for **1 hour at room temperature (25 °C \pm 1 °C)**.
9. After incubation, discard the solution into sink by quick decantation and blot the plate dry by tapping gently onto a paper towel.
If an automatic plate washer is being used, **wash** each well **3 times** with **300 μ L (0.3 mL) of the Wash Solution**. If a squeeze bottle is used, fill the wells with the Wash Solution carefully and decant the buffer from the microwells. Repeat the procedure two more times and blot the plate dry with a paper towel.
10. Add **100 μ L of IgG Enzyme Conjugate** reagent (see #1, Section 7, Reagent Preparation) to all microwells except wells A1 and B1.
11. Cover the plate with a parafilm/plastic wrap and let it stand at **room temperature (25 °C \pm 1 °C) for one hour**.
12. After incubation, **repeat the washing step** (step #9) and blot the microwells dry.
13. Add **0.1 mL (100 μ L) of Substrate Solution** to all microwells including wells A1 and B1. Be sure to dispense the substrate reagent at a rapid steady pace without any interruption.
On occasion substrate may display a yellowish color. This color will not interfere with test results.
14. Cover the plate and leave it in the dark for **30 minutes at room temperature (25 °C \pm 1 °C)**.
15. After 30 minutes promptly add **50 μ L of the Stop Solution** into each well at a rapid steady pace without any interruption.
16. Set up microplate reader to **read the absorbance at 405 nm** according to manufacturing instructions, and blank the plate reader with well A1 or B1.
17. Calculate the data according to Section 9.

9 CALCULATION OF DATA

Record the spectrophotometric readings [optical density (OD) in absorbance units] as shown in the example (ICA Sample Data). The actual OD reading from your ICA ELISA may be different. This is only an example.

1. Calculate the average O.D. reading of the Reference, Negative and Positive Controls and Patient samples done in duplicate.

The average reading (mean) of the Reference Control is R_m ,
of the Negative Control is N_m ,
of the Positive Control is P_m , and
of sample data is S_m .

2. Divide the average O.D. of Samples and Controls by the R_m value. This gives a Ratio Value for each sample.

Interpretations:

ICA Ratio Value	Result
< 0.95	Negative
> 1.05	Positive
0.95 – 1.05	Indeterminate (Borderline)

Samples with Ratio values < 0.95 show a *low level* of ICA antibodies.

Values > 1.05 show a *high level* of ICA antibodies.

Samples with values between 0.95 and 1.05 are considered as *indeterminate*. The suggestion is to repeat indeterminate samples or to run in parallel with a new sample taken at a later date.

ICA ELISA - SAMPLE DATA

Section A: Control Results

Data				
Controls	O.D.	Ave. O.D.	Ratio value	Result
Reference Ctrl	1.072 1.092	$R_m = 1.082$	1.00	
Negative Ctrl	0.290 0.303	$N_m = 0.297$	0.27	Negative
Positive Ctrl	1.413 1.406	$P_m = 1.409$	1.30	Positive

Note: For a valid test, the ratio value for N_m should be < 0.95 and P_m > 1.05.
Repeat the test if results are not valid.

Section B: Patient Sample Results

Data				
Sample	O.D.	Ave. O.D.	Ratio value	Result
Reference Ctrl	1.072 1.092	$R_m = 1.082$	1.00	
1	1.444 1.472	$S_{1m} = 1.458$	1.35	Positive
2	0.549 0.534	$S_{2m} = 0.541$	0.50	Negative
3	1.036 1.051	$S_{3m} = 1.043$	0.96	Intermediate

10 QUALITY CONTROL

Negative and Positive Controls must be run along with unknown samples each time in order for results to be valid. The Negative Control should show a ratio value < 0.95 and the Positive Control should show a value > 1.05.

11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The specificity of antigen coated ICA microwell strips was established by Western blot analysis using confirmed positive samples for IgG to Islet Cell Antigens.

Samples with thyroid autoantibodies and rheumatoid factors read negative on Islet Cell Autoantibodies (ICA) ELISA.

12 CLINICAL SIGNIFICANCE

This in vitro test procedure detects the presence of ICA antibodies in patient sera. Results obtained by using this procedure alone must not be used for the diagnosis of IDDM.

Save the weak positive and borderline samples (within 5% of the Reference control) and store at -20 °C. Fresh samples from these patients should be tested again every six months together with the previous serum samples.

THIS IS A SCREENING TEST ONLY.

THE DIAGNOSIS OF IDDM SHOULD BE MADE WITH DATA FROM THE PATIENT'S MEDICAL HISTORY, CLINICAL SYMPTOMS, AND RESULTS OF OTHER TESTS.

13 LIMITATIONS AND SOURCES OF ERROR

1. Although a higher ICA titer will produce a higher O.D. reading, the test is designed for qualitative determination of ICA only.
2. Poor test reproducibility may result from:
 - a. Inconsistent delivery of reagents;
 - b. Improper storage of reagents;
 - c. Improper reconstitution of reagents;
 - d. Incomplete washing of microwells;
 - e. Substrate reagent old or exposed to light;
 - f. Unstable/defective spectrophotometer;
 - g. Error in following the assay procedure.

1 EINFÜHRUNG UND VERWENDUNGSZWECK

Der insulinabhängige Diabetes mellitus (IDDM) oder Typ I-Diabetes ist eine chronische Erkrankung, die Bildung und Ausschüttung des Schlüsselhormons Insulin beeinträchtigt und den Blutzuckerstoffwechsel verändert. Bildung und Ausschüttung des Insulins erfolgen in den Inselzellen des Pankreas, den so genannten Langerhans Inseln(1). Bei IDDM-Patienten(2-4) ist die Störung der Insulinbildung durch immunologische Zerstörung der Inselzellen durch Autoantikörper bedingt. Solche Störungen (Autoimmunität) können genetisch bedingt sein und/oder durch äußere Einflüsse wie giftige Chemikalien, Vireninfektionen und verschiedenen Arten von Stress(5) ausgelöst werden.

Der IDDM ist gekennzeichnet durch ein asymptomatisches Prädiabetesstadium, das sich über mehrere Jahre erstrecken kann. Während dieses Stadiums zeigen Betroffene eine verminderte Insulinausschüttung in der Frühphase als Antwort auf eine intravenöse oder orale Glukosetoleranzbelastung. In der Mehrzahl der Fälle weisen diese Personen zirkulierende Inselzellautoantikörper (ICA) und/oder Insulinautoantikörper (IAA) auf. Inselzellautoantikörper sind bis zu acht Jahre vor dem klinischen Krankheitsbild des IDDM(6) nachweisbar und können damit als früher Indikator der Krankheit oder einer Veranlagung für diese dienen. ICA-positive Personen zeigen unter Umständen einen fortschreitenden Verlust der Inselzellfunktion, womit die Störung der Insulinausschüttung während der Frühphase zu erklären ist. Kommt diese vollständig zum Erliegen, entwickelt sich das klinische Bild des IDDM(6).

Inselzellautoantikörper sind bei 70% der Patienten mit kürzlichem Beginn eines IDDM(13,14) nachweisbar, während sie nur bei 0,1 – 0,5 % der nicht-diabetischen Kontrollgruppe(11,15) vorhanden sind. ICA können auch bei Verwandten ersten Grades von IDDM-Patienten festgestellt werden. Diese Personen gehören zu der Risikogruppe, die mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Typ I-Diabetes entwickelt. In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass ICA-positive Verwandte ersten Grades von IDDM-Patienten in der Folgezeit ebenfalls an Diabetes erkrankten(16-19). Andere Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass das Vorhandensein von Serum-ICA und IAA ein Indikator für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines Typ I-Diabetes ist. Aus diesem Grund ist der serologische Nachweis von ICA ein entscheidender Indikator für die frühe Diagnose eines Typ I-Diabetes. Die Bedeutung dieser Autoantikörper als Marker eines IDDM wird auch durch ihr Vorhandensein bei Nicht-Diabetikern, die später einen IDDM entwickeln, verdeutlicht. Riley und andere haben kürzlich berichtet, dass durch den Nachweis von ICA bei Typ II-Diabetikern eine Erkrankung mit IDDM vor dem Auftreten klinischer Symptome festgestellt und die Notwendigkeit einer Insulintherapie(20) prognostiziert werden konnte. Daher kann sich das Krankheitsbild bei Patienten, die zunächst mit Typ II-Diabetes diagnostiziert werden und Träger von Serum-ICA sind, soweit verschlechtern, dass eine Insulinabhängigkeit entsteht.

Der frühe Nachweis zirkulierender Inselzellautoantikörper ist entscheidend, um in der Bevölkerung Personen mit erhöhtem Risiko sowie Geschwister und Familien von IDDM-Patienten zu identifizieren, für die aufgrund ihrer genetischen Prädisposition ein erhöhtes Risiko besteht, Diabetes zu entwickeln. Während eines internationalen ICA-Workshops wurde die dringende Notwendigkeit eines ELISA-Tests (heterogener Enzym-Immunoassay) zum Nachweis der Inselzellautoimmunität betont(21).

Aktuell werden Serum-ICA durch indirekte Immunofluoreszenz und histochemische Methoden bestimmt. Dazu werden gefrorene unfixierte Pankreasschnitte von Menschen, Primaten oder Nagetieren als Substrat verwendet. Trotz zahlreicher Versuche, dieses Verfahren seit seiner Erstbeschreibung im Jahr 1974 (22,23) zu verbessern und abzuändern, wird die indirekte Immunofluoreszenz bzw. histochemische Methode durch inhärente methodologische Schwierigkeiten beeinträchtigt. Eine Standardisierung dieses Verfahrens hat sich als sehr kompliziert erwiesen. Dies liegt daran, dass die Zuverlässigkeit dieses mit einem gefrorenen Schnitt arbeitenden Verfahrens durch Faktoren wie die Unterschiede zwischen verschiedenen Pankreas, der unvermeidliche Bedarf an unfixiertem Pankreasgewebe und die unregelmäßige Verfügbarkeit des passenden Gewebes begrenzt wird.

Der DRG Islet Cell Autoantibodies (ICA) ELISA ist ein qualitativ hochwertiger ELISA-Test zum in vitro Nachweis zirkulierender IgG-Antikörper gegen Inselzellantigene des Pankreas.

2 TESTPRINZIP

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden mit einer gereinigten Mischung Pankreas-Antigene beschichtet. Während einer Inkubationszeit bei Raumtemperatur reagieren die Antikörper in der Serumprobe mit Antigenmolekülen in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Nach dem Auswaschen überschüssiger bzw. nicht gebundener Serummaterialien wird ein enzymbeladener (alkalische Phosphatase) Ziege-Antikörper, spezifisch gegen humanes IgG, dem Antigen-Antikörper-Komplex hinzugefügt. Nach nochmaligem Waschen wird ein Substrat (PNPP) hinzugegeben und die entstandene Farbe in einem Spektrophotometer gemessen. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration an ICA in der Probe. Eine ICA-positive Kontrolle dient als interner Qualitätsstandard und sichert die Ergebnisse ab.

3 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Material mit möglicher Gesundheitsgefährdung

Die Matrix der Kalibratoren und Kontrollen besteht aus Humanserum. Die verwendeten Humanseren ergaben bei der Prüfung auf HbsAg bzw. Antikörper gegen HIV-1/2 und HCV mit von der amerikanischen Nahrungsmittel- und Drogenbehörde (FDA) lizenzierten Reagenzien ein negatives Ergebnis. Da es jedoch kein Testverfahren gibt, das das Vorhandensein von HIV, Hepatitis B Virus oder anderen infektiösen Erregern mit absoluter Sicherheit ausschließen kann, sind die Reagenzien als potentiell infektiöses Material zu behandeln.

2. Natriumazid

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei, Kupfer oder Messing explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung dieser Materialien sind die speziellen Richtlinien zu beachten.

3. Stopplösung

Bei der Stopplösung handelt es sich um 1N NaOH. Beim Umgang mit dieser starken Base ist Vorsicht geboten. Sie kann Verätzungen verursachen und sollte nur mit Handschuhen angefasst werden. Empfehlenswert sind darüber hinaus Schutzkleidung und Schutzbrille, ein Einatmen ist zu vermeiden. Verschüttete Säure sollte zunächst mit Wasser verdünnt werden, bevor sie mit Papiertüchern aufgenommen wird.

4. Substratlösung

Substratlösung besteht aus para-Nitrophenylphosphaten (PNPP), einem chromogenen Nicht-Protein-Substrat, das in diesem ELISA-Test verwendet wird. Gelegentlich kann das Substrat eine gelbliche Farbe aufweisen. Diese Farbe beeinträchtigt nicht die Testergebnisse.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Die Testreagenzien dürfen nicht eingefroren werden. Alle Testkit-Komponenten sind ständig bei 2 °C - 8 °C zu lagern.
2. Positive und negative Kontrollen müssen in jedem Testlauf mitgeführt werden.
3. Es sollten nur klare Serumproben verwendet werden. Übermäßig getrübe, hämolytische oder mikrobiell kontaminierte Proben dürfen nicht verwendet werden.
4. Alle Proben sind in Doppelbestimmung zu analysieren.
5. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht gemischt werden.
6. Reagenzien mit abgelaufenem Haltbarkeitsdatum dürfen nicht mehr verwendet werden.
7. Reagenzien nicht über einen längeren Zeitraum bei Raumtemperatur aufbewahren.
8. Die Substratlösung ist im Dunkeln aufzubewahren.
9. Ein sorgfältiges Pipettierverfahren ist notwendig, um reproduzierbare und genaue Ergebnisse zu erzielen.

4 REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Im Lieferumfang enthaltene Materialien:

1.	PLA ICA	Mikrotiterstreifen (mit Halterung)	12 strips
2.	CONJ ENZ 6X	ICA-Anti-Human-IgG-Enzymkonjugat (Konz.)	2 x 1,0 mL
3.	DIL SPE 5X	Probenverdünnungspuffer (Konz.)	1 x 25,0 mL
4.	CONJ ENZ DIL	Konjugatverdünnungspuffer	1 x 10,0 mL
5.	CTRL REF ICA	Referenzkontrolle	1 x 1,5 mL
6.	CTRL + ICA	Positivkontrolle (Humanserum)	1 x 1,5 mL
7.	CTRL – ICA	Negativkontrolle (Humanserum)	1 x 1,5 mL
8.	SUBS PNPP	Substratlösung (PNPP)	1 x 15,0 mL
9.	BUF WASH 25X	Waschpuffer (Konzentrat)	1 x 20,0 mL
10.	SOLN STP	Stopplösung (1N NaOH)	1 x 6,0 mL

5 WEITERE ERFORDERLICHE, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
2. Zellstoff zum Trocknen der Streifen nach dem Waschen sowie Parafilm bzw. Plastikfolie zum Abdecken der Streifen während der Inkubation.
3. Glasröhrchen in passenden Größen zur Serumverdünnung.
4. Mikropipetten mit auswechselbaren Spitzen 10 µL, 50 µL und 100 µL.
5. Ein Plattenwaschgerät oder eine Spritzflasche zum Waschen der Mikrotiterplatten.
6. 5-ml-Pipetten zur Pipettierung von Konjugatverdünnungspuffer.
7. Ein 500-mL-Messzylinder.
8. Mikrotiterplatten-Lesegerät mit einer Absorptionskapazität von 405 nm.
9. Plastiketikettierband zum Verschließen unbenutzter Vertiefungen vor dem Test.

6 PROBENGEWINNUNG

5 mL -10 mL Blut werden durch Venenpunktion entnommen und in einem Gerinnungsröhrchen (roter Verschluss) gesammelt. Serumseparatoren können verwendet werden. Das Serum wird durch Zentrifugation gewonnen.

Serumproben bei 2 °C - 8 °C lagern.

Übermäßig hämolytische Proben sowie Proben, die große Gerinnsel enthalten oder durch mikrobielles Wachstum kontaminiert sind, können die Testergebnisse beeinflussen.

Wenn die Serumproben nicht innerhalb von 24 Stunden bestimmt werden können, sind sie bei -20 °C einzufrieren.

7 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

1. Rekonstitution des IgG-Enzymkonjugats:

Exakt 5 mL des Konjugatverdünnungspuffers werden in eine Flasche, die das ICA-IgG-Enzymkonjugat (Konzentrat) enthält, überführt. Flasche verschließen und Inhalt durch mehrfaches Umkehren der Flasche gründlich mischen. Verdünntes Konjugat bis zur Verwendung bei 2 °C - 8 °C lagern. Datum der Rekonstitution auf dem Etikett vermerken.

Verdünntes Reagenz 30 Tage nach Rekonstitution nicht mehr verwenden.

Es werden zwei Flaschen mit Konjugatkonzentrat geliefert. Jede Flasche enthält ausreichend Konjugat für 6 Mikrotiterstreifen. Rekonstitution nach Bedarf.

2. Probenverdünnungspuffer:

Falls das Probenverdünnungspuffer-Konzentrat aufgrund einer Lagerung bei Temperaturen unterhalb von 2 °C - 8 °C einen Niederschlag (Präzipitat) enthält, muss dies in einem Wasserbad bei 37 °C für 30 Minuten wieder gelöst werden.

Den gesamten Inhalt (25 mL) in ein geeignetes Gefäß mit 100 mL destilliertem/deionisiertem Wasser geben. Gründlich mischen, Gefäß mit "Probenverdünnungspuffer" beschriften und bei 2 °C - 8 °C lagern.

Das verdünnte Reagenz ist bis zu dem auf der Flasche angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Beachten Sie, dass der möglicherweise im Konzentrat enthaltene Niederschlag keinen Einfluss auf die Testdurchführung hat und in der 1X-Arbeitslösung nicht mehr vorhanden ist.

3. Waschlösung:

Sind aufgrund einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen (2 °C - 8 °C) Kristalle im Waschpuffer-Konzentrat vorhanden, sind die Kristalle durch ein 30-minütiges Platzieren des Gefäßes in einem 37 °C-Wasserbad oder einem Inkubator aufzulösen.

Gesamten Inhalt in ein 500-mL-Gefäß mit 480 mL destilliertem/deionisiertem Wasser geben. Gründlich mischen, Gefäß mit "Waschlösung" beschriften und bei 2 °C - 8 °C lagern.

Das verdünnte Reagenz ist bis zu dem auf der Flasche angegebenen Verfallsdatum haltbar.

4. Vorbereitung der Serumprobe:

Exakt 10 µL (0,010 mL) der Serumprobe werden in 1,0 mL des Probenverdünnungspuffers in ein bereits etikettiertes Glasröhrchen pipettiert. Gründlich mischen.

8 TESTVERFAHREN

Das Testkit enthält 12 mit gereinigten Inselzellantigenen beschichtete Mikrotiterstreifen. Die Anzahl der in jedem Assay verwendeten Mikrotiterstreifen hängt von der zu testenden Anzahl Serumproben ab.

Wenn 12 Mikrotiterstreifen verwendet werden, können mit diesem Testkit insgesamt 45 Patientenseren in Doppelbestimmung getestet werden.

WICHTIGER HINWEIS:

Vor Testbeginn müssen alle Reagenzien einschließlich Serumproben auf Raumtemperatur (25 °C) gebracht werden. Inkubationstemperaturen, die um mehr als ± 1 °C abweichen, beeinflussen nachgewiesenermaßen die Ergebnisse.

1. Die für den Test benötigte Anzahl an Streifen in die mitgelieferte Halterung einsetzen. Die Mikrotiterstreifen müssen an der dafür vorgesehenen Stelle fest einrasten, da sie ansonsten hinausfallen und zerbrechen können.
2. Machen Sie sich mit dem Indexsystem der Vertiefungen vertraut, z.B. A1, B1, C1, D1 usw.
3. **100 µL Negativkontrolle** in die Vertiefungen C1 und D1 pipettieren.
4. **100 µL Positivkontrolle** in die Vertiefungen E1 und F1 pipettieren.
5. **100 µL Referenzkontrolle** in die Vertiefungen G1 und H1 pipettieren.
6. **100 µL der verdünnten Serumprobe** (siehe 7. Vorbereitung der Reagenzien und Lagerung, Punkt 4) in die Vertiefungen A2 und B2 pipettieren. Für weitere Serumproben die entsprechende Anzahl zusätzlicher Streifen verwenden und die verdünnten Proben in Doppelbestimmung in die Vertiefungen pipettieren. In jeder Vertiefung sollten sich 100 µL zu testender Lösung befinden, mit Ausnahme der Vertiefungen A1 und B1, die momentan noch leer sind und zu einem späteren Zeitpunkt verwendet werden.
7. Alle nicht benötigten Streifen sind sorgfältig in dem dafür vorgesehenen Gleitverschlussbeutel mit Trockenmittel bis zum nächsten Testansatz aufzubewahren. Alle auf einem Streifen nicht verwendeten Vertiefungen sind sorgfältig abzudecken und für den nächsten Testansatz aufzubewahren.
8. Platte mit Parafilm oder Plastikfolie abdecken, um eine Kontamination zu vermeiden und **für 1 Stunde bei Raumtemperatur (25 °C \pm 1 °C) inkubieren** lassen.
9. Nach Inkubation Vertiefung schnell mit Waschpuffer füllen und Platte auf einer Zellstoffunterlage trocken klopfen. Falls ein automatisches Waschgerät verwendet wird, jede Vertiefung **dreimal mit 300 µL (0,3 mL) Waschpuffer waschen**. Bei Verwendung einer Spritzflasche Vertiefungen sorgfältig mit Waschpuffer füllen und Puffer aus den Vertiefungen wegschütten. Verfahren zwei Mal wiederholen. Platte auf Papiertuch trocken klopfen.
10. **100 µL Enzymkonjugat** (siehe 7. Vorbereitung der Reagenzien und Lagerung, Punkt 1) in jede Vertiefung pipettieren, mit Ausnahme der Vertiefungen A1 und B1.
11. Platte mit Parafilm oder Plastikfolie bedecken und **1 Stunde bei Zimmertemperatur (25 °C \pm 1 °C)** stehen lassen.
12. Nach Inkubation Waschschrift (Punkt 9) wiederholen und die Vertiefungen der Mikrotiterplatte trocken klopfen.
13. **100 µL Substratlösung** in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte, einschließlich der Vertiefungen A1 und B1, pipettieren. Es sollte sichergestellt werden, dass das Substratreagenz schnell und ohne Unterbrechung pipettiert wird.
Gelegentlich kann das Substrat eine gelbliche Farbe aufweisen. Diese Farbe beeinträchtigt nicht die Testergebnisse.
14. Platte abdecken und **30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (25 °C \pm 1 °C)** stehen lassen.
15. Nach 30 Minuten **50 µL Stopplösung** schnell und ohne Unterbrechung in jede Vertiefung pipettieren.
16. Mikrotiterplatten-Lesegerät gemäß Herstellerhinweisen einstellen und Absorption **bei 405 nm messen**. Die Vertiefungen A1 und B1 können zur Leerwerteinstellung des Lesegeräts verwendet werden.
17. Daten gemäß Abschnitt 9 auswerten.

9 TESTAUSWERTUNG

Die spektrophotometrisch erhaltenen optischen Dichten (OD) in Absorptionseinheiten werden wie im Beispielprotokoll aufgetragen. Die tatsächlich im angesetzten ICA ELISA gemessenen OD-Ergebnisse können hiervon abweichen. Dies ist nur ein Beispiel.

- Den Mittelwert der OD-Ergebnisse der Referenz-, Negativ- und Positivkontrolle sowie der in Doppelbestimmung vorgenommenen Patientenproben berechnen.

Die mittlere OD der Referenzkontrolle wird mit R_m , die der Negativkontrolle mit N_m , die Positivkontrolle mit P_m und die Proben mit S_m gekennzeichnet.

- Die mittlere OD der Proben und Kontrollen durch den R_m -Wert dividieren. Das ergibt den Verhältniswert (Quotienten) für die einzelnen Proben.

Interpretation der Ergebnisse:

ICA Quotient	Ergebnis
< 0.95	Negativ
> 1.05	Positiv
0.95 – 1.05	Nicht determiniert (Grenzwert)

Proben mit Verhältniswerten von < 0,95 weisen auf eine niedrige und Werte von > 1,05 auf eine hohe Konzentration von Inselzellautoantikörpern hin.

Proben mit Werten zwischen 0,95 und 1,05 werden als grenzwertig betrachtet. Grenzwertige Proben sollten wiederholt oder parallel zu einer neuen (später entnommenen) Probe durchgeführt werden.

Islet Cell Autoantibodies (ICA) ELISA Beispieldaten

Abschnitt A: Kontrollergebnisse

Daten				
Kontrollen	O.D.	OD-Mittelwert	Quotient	Ergebnis
Referenzkontrolle	1.072 1.092	$R_m = 1.082$	1.00	
Negative Kontrolle	0.290 0.303	$N_m = 0.297$	0.27	Negativ
Positive Kontrolle	1.413 1.406	$P_m = 1.409$	1.3	Positiv

Hinweis: Für einen gültigen Test sollte der Quotient für $N_m < 0.95$ und für $P_m > 1.05$ sein. Im Falle eines ungültigen Testergebnisses muss der Test wiederholt werden.

Abschnitt B: Ergebnisse der Patientenprobe

Daten				
Proben	O.D.	OD-Mittelwert	Quotient	Ergebnis
Referenzkontrolle	1.072 1.092	$R_m = 1.082$	1.00	
1	1.444 1.472	$S_{1m} = 1.458$	1.35	Positiv
2	0.549 0.534	$S_{2m} = 0.541$	0.5	Negativ
3	1.036 1.051	$S_{3m} = 1.043$	0.96	Grenzwertig

10 QUALITÄTSKONTROLLE

Positiv- und Negativkontrollen müssen gemeinsam mit den unbekanntem Serumproben in jedem Testlauf mitgeführt werden, um die Richtigkeit der Ergebnisse zu überprüfen.

Die Negativkontrolle sollte einen Quotient von $< 0,95$ zeigen und der Wert der Positiv-Kontrolle sollte bei $> 1,05$ liegen.

11 LEISTUNGSMERKMALE

Die Spezifität der mit Antigen beschichteten ICA-Mikrotiterstreifen wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung bestätigter positiver Proben für IgG gegen Inselzellantigene festgestellt.

Proben mit Schilddrüsen-Autoantikörper und Rheumafaktoren zeigten ein negatives Ergebnis im ICA-ELISA.

12 KLINISCHE BEDEUTUNG

Dieses in vitro Testverfahren dient zum Nachweis von Autoantikörpern gegen humanes Insulin in Patientenserum.

Ergebnisse, die alleine mittels dieses Verfahrens gewonnen wurden, sind nicht für die Diagnose eines IDDM geeignet.

Schwachpositive und grenzwertige Proben (innerhalb 5 % der Referenzkontrolle) sind aufzubewahren und bei -20 °C zu lagern. Frische Proben dieser Patienten sind nach jeweils 6 Monate zusammen mit den früheren Proben erneut zu testen.

DIES IST LEDIGLICH EIN SCREENING-TEST.

Eine IDDM-Diagnose ist unter Einbezug der medizinischen Vorgeschichte des Patienten, der klinischen Symptome und der Ergebnisse aus weiteren Tests zu stellen.

13 GRENZEN DES VERFAHRENS UND FEHLERQUELLEN

1. Obwohl ein höherer ICA-Titer zu höheren Werten der optischen Dichte (OD) führt, ist der Test nur für eine qualitative Bestimmung von ICA entwickelt worden.
2. Eine schlechte Testreproduzierbarkeit kann folgende Ursachen haben:
 - a. Lieferabweichungen bei Reagenzien
 - b. Unsachgemäße Lagerung der Reagenzien
 - c. Unsachgemäße Rekonstitution der Reagenzien
 - d. Unzureichendes Waschen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte
 - e. Substratreagenz ist alt oder wurde dem Licht ausgesetzt
 - f. Unstabiles oder defektes Spektrophotometer
 - g. Fehler beim Befolgen der Angaben zur Assay-Durchführung

Test ELISA qualitativo per l'identificazione di autoanticorpi circolanti contro gli antigeni anti-insula

1 INTRODUZIONE E USO PREVISTO

Il diabete mellito insulino-dipendente (IDDM), classificato di "tipo 1", è una malattia cronica debilitante che inibisce la produzione e secrezione dell'insulina (un ormone chiave) e altera il metabolismo dei glucidi nel sangue. L'insulina è un ormone sintetizzato secreto dal pancreas, esattamente dalle beta-cellule delle isole di Langerhans(1). Nei pazienti affetti dall'IDDM, la disfunzione nella sintesi insulinica è il prodotto della distruzione immunologica delle cellule pancreatiche(2-4). Tali anomalie autoimmunitarie possono essere ricondotte ad una predisposizione genetica (fattori ereditari), ma possono anche innescarsi con l'esposizione a sostanze chimiche tossiche, infezioni virali e varie forme di stress(5).

Il diabete mellito insulino-dipendente è caratterizzato da una fase pre-diabetica asintomatica che può durare per anni, nel corso della quale i soggetti affetti manifestano una residua secrezione insulinica come risposta alla somministrazione di glucosio orale o endovena. Nella maggioranza dei casi, questi soggetti sono portatori di autoanticorpi delle isole pancreatiche (ICA) circolanti e/o di autoanticorpi insulinici (IAA). Gli ICA sono rilevabili fino ad otto anni preliminarmente allo scatenarsi del quadro clinico IDDM(6) e pertanto possono fungere da marcatori precoci della patologia o di una predisposizione all'IDDM. I soggetti risultati ICA-positivi possono manifestare una perdita progressiva della funzione pancreatiche, indicata da una disfunzione nella secrezione insulinica. L'insorgenza dell'IDDM clinico avviene nel momento in cui la secrezione insulinica si arresta del tutto(6).

Gli autoanticorpi delle isole pancreatiche sono stati individuati nel 70% dei pazienti con esordio recente di IDDM(13,14), rispetto allo 0,1 ~ 0,5% della popolazione di controllo non diabetica(11,15). Gli ICA sono altresì identificati nei familiari di primo grado di pazienti IDDM. Questi soggetti compongono il gruppo della popolazione umana considerato ad alto rischio. Diversi studi clinici hanno concluso che i familiari di primo grado, ICA-positivi, di pazienti IDDM hanno un esordio successivo di diabete(16-19). Altri studi suggeriscono inoltre che la presenza di ICA ed IAA nel siero è un indicatore della probabilità che individui geneticamente suscettibili manifestino l'IDDM(3,6-12). L'identificazione sierologica degli ICA è dunque un mezzo potente per la diagnosi precoce dell'IDDM. Il significato di questi autoanticorpi quali marcatori dell'IDDM è altresì illustrato dalla loro presenza in individui non diabetici che alla fine manifestano l'IDDM. Riley, et al. hanno concluso di recente che la determinazione degli ICA nel diabete di "tipo 2" può identificare l'IDDM prima dello scatenarsi dei sintomi clinici e predire quindi la necessità di intervenire con terapia insulinica(20). I pazienti inizialmente diagnosticati come affetti da diabete tipo 2 e portatori di ICA possono quindi peggiorare e divenire insulino-dipendenti.

L'identificazione precoce degli ICA in circolo è dunque importante per evidenziare nella popolazione generale gli individui, tra fratelli e famiglie di pazienti IDDM, ad alto rischio di sviluppare la malattia perché geneticamente predisposti al diabete. Un simposio internazionale sugli ICA ha sottolineato l'imminente necessità di sviluppare un test ELISA per la determinazione dell'autoimmunità delle isole pancreatiche(21).

Al momento, la presenza degli ICA nel siero è stabilita per immunofluorescenza indiretta e metodi istochimici, impiegando quali substrati libere sezioni pancreatiche congelate di soggetti umani/primati o di roditori. Nonostante vari tentativi mirati a perfezionare e modificare questa procedura dalla sua definizione originale nel 1974(22,23), la tecnica per immunofluorescenza indiretta/istochimica dimostra inerenti deficienze metodologiche. Particolarmente difficile è la sua standardizzazione, poiché utilizzando una sezione congelata del pancreas è limitata da fattori inerenti alla variazione inter-pancreas, dall'inevitabile necessità di reperire tessuto pancreatico libero e della scarsa disponibilità del tessuto adatto.

ICA ELISA è un test ELISA qualitativo per l'identificazione in vitro di anticorpi IgG circolanti contro gli antigeni delle isole pancreatiche.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Una miscela purificata di antigeni pancreatici viene immobilizzata in micropozzetti. Durante l'incubazione a temperatura ambiente, gli anticorpi nel campione sierico reagiscono con le molecole di antigene nei micropozzetti. Una volta eliminato il materiale sierico non legato, il complesso antigene-anticorpo è associato per fosfatasi alcalina con un enzima (anticorpo di capra) specifico dell'IgG umana. Dopo un ulteriore lavaggio, viene aggiunto un substrato (PNPP) e il colore generato viene misurato per spettrofotometria. L'intensità cromatica che si genera è direttamente proporzionale alla concentrazione di ICA nel campione. Un controllo ICA-positivo funge da controllo della qualità interno per la convalida dei risultati.

3 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Materiali dal potenziale rischio biologico

I calibratori ed i controlli sono costituiti da siero umano, il quale è stato analizzato con reagenti approvati dall'ente FDA (Food and Drug Administration) e ritenuto non reattivo nei test per l'antigene di superficie dell'epatite B (HbsAg), HIV-2 e HCV. Dal momento che nessun test è in grado di offrire assoluta certezza in merito all'assenza di agenti infettivi, quali HIV, epatite B virale, questi reagenti devono essere trattati come potenzialmente in grado di trasmettere infezioni.

2. Azotidrato di sodio

Alcuni reagenti possono contenere azotidrato di sodio come conservante, il quale può reagire con il piombo, il rame o l'ottone dando luogo alla formazione di azotidrati metallici dal potenziale esplosivo. Per eliminare questi materiali, irrorare le tubature con grossi volumi di acqua per evitare l'accumulo di azotidrato.

3. Soluzione bloccante

La soluzione bloccante è un composto di 1 N HaOH, una base forte che va trattato con grande cautela poiché può provocare ustioni. Indossare un paio di guanti occhiali e indumenti di protettivi per maneggiare il materiale. Non inalare e diluire i versamenti con l'acqua prima di assorbirli con carta da cucina.

4. Soluzione substrato

Soluzione substrato è costituita da para-Nitrofenilfosfato (PNPP), un substrato cromogenico non proteinico utilizzato in questo test ELISA. A volte il substrato può mostrare un colore giallastro. Questo colore non interferirà con i risultati del test.

Precauzioni

1. Non congelare i reagenti del test; conservare tutti i componenti del kit a 2 °C - 8 °C.
2. I controlli positivo e negativo devono essere eseguiti nuovamente ad ogni ripetizione del test.
3. Come campioni per il test, utilizzare solamente siero trasparente, non torbido, in assenza di emolisi o contaminazioni microbiche.
4. Tutti i campioni devono essere analizzati in duplicato.
5. Non mescolare reagenti prelevati da partite di prodotto diverse.
6. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.
7. Non conservare i reagenti a temperatura ambiente per periodi prolungati.
8. Non esporre la soluzione substrato alla luce.
9. Adottare un'attenta tecnica di pipettazione per garantire riproducibilità e accuratezza dei dati.

4 REAGENTI E MATERIALI

Materiali in dotazione

1.	PLA ICA	Strisce per micropozzetto ICA (con contenitore)	12 strips
2.	CONJ ENZ 6X	Coniugato enzimatico IgG ICA anti-umano(conc)	2 x 1,0 mL
3.	DIL SPE 5X	Diluyente per campione ICA (concentrato)	1 x 25,0 mL
4.	CONJ ENZ DIL	Diluyente per coniugato	1 x 10,0 mL
5.	CTRL REF ICA	Controllo riferimento ICA	1 x 1,5 mL
6.	CTRL + ICA	Controllo positivo ICA (siero umano)	1 x 1,5 mL
7.	CTRL - ICA	Controllo negativo ICA (siero umano)	1 x 1,5 mL
8.	SUBS PNPP	Soluzione di substrato (PNPP)	1 x 15,0 mL
9.	BUF WASH 25X	Tampone di lavaggio (concentrato)	1 x 20,0 mL
10.	SOLN STP	Soluzione bloccante (1N HaOH)	1 x 6,0 mL

5 ALTRI MATERIALI OCCORRENTI (NON IN DOTAZIONE)

1. Acqua distillata o deionizzata.
2. Carta assorbente per asciugare le strisce dopo il lavaggio e pellicola di plastica per sigillare le strisce durante l'incubazione.
3. Provette di vetro di misura adatta per la diluizione del siero.
4. Micropipetta con punte usa e getta per dispensare 10 µL, 50 µL e 100 µL.
5. Lavatore per piastre microtiter o flacone morbido per il lavaggio.
6. Pipette da 5 mL per il diluente del coniugato.
7. Un cilindro graduato da 500 mL.
8. Lettore per piastre microtiter con capacità di assorbanza a 405 nm.
9. Etichette di plastica adesive per proteggere i pozzetti inutilizzati prima dell'analisi.

6 RACCOLTA DEL CAMPIONE

Con una siringa, prelevare 5 ~ 10 mL di sangue e raccoglierlo in una fiala (sommità di colore rosso), avvalendosi eventualmente di separatori per il siero. Separare il siero per centrifugazione. I campioni di siero devono essere conservati a 2 °C - 8 °C. Un'eccessiva emolisi e la presenza di grossi coaguli o di crescita microbica nel campione possono interferire con la conduzione del test. Congelare il siero a -20 °C se non si prevede di analizzarlo entro le successive 24 ore.

7 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE

1. Ricostituzione del coniugato enzimatico ICA-IgG

Con dosaggio preciso, trasferire 5 mL di diluente per coniugato in un flacone contenente coniugato enzimatico ICA-IgG (concentrato). Chiudere il tappo e mescolare agitando il flacone più volte per inversione. Conservare il coniugato diluito a 2 °C - 8 °C quando non è in uso. Annotare la data della ricostituzione sull'etichetta del flacone. Il reagente così diluito è stabile per un massimo di 30 giorni dalla ricostituzione. Sono forniti nella dotazione due flaconi di coniugato concentrato. Il contenuto di un flacone è sufficiente per sei strisce di test. Ricostituire un altro coniugato secondo necessità.

2. Tampone diluente per campione

Se precipitano è presente nel concentrato di diluente per campione a causa di archiviazione di temperatura più bassa, come ad esempio 2 °C - 8 °C, sciogliere ponendo la provetta a bagnomaria a 37 °C per 30 minuti.

Trasferire l'intero contenuto (25 mL) in un contenitore adatto con 100 mL di acqua distillata/deionizzata. Mescolare abbondantemente; applicare un'etichetta al contenitore per indicare il contenuto (diluente campione) e conservarlo a 2 °C - 8 °C. Il reagente diluito è stabile sino alla data riportata sulla provetta.

Si noti che il precipitato visto nel concentrato non ha alcun effetto sulle prestazioni del test e non sarà presente in 1X diluente per campione.

3. Tampone di lavaggio

In presenza di cristalli nel tampone di lavaggio concentrato, dovuti a conservazione a temperature inferiori (es. 2 °C - 8 °C), dissolvere ponendo la provetta in un bagno ad acqua o in una incubatrice a 37 °C per 30 minuti.

Trasferire l'intero contenuto in un contenitore capiente con 480 mL di acqua distillata/deionizzata. Mescolare abbondantemente; affiggere un'etichetta al contenitore e conservarlo a 2 °C - 8 °C. Il reagente diluito è stabile sino alla data riportata sulla provetta.

4. Preparazione del campione sierico

Con dosaggio preciso, pipettare 10 µL di campione sierico in 1,0 mL di diluente per campione, in una provetta di vetro già dotata di etichetta e mescolare abbondantemente.

8 PROCEDURA DI ANALISI

Il kit del test contiene 12 strisce per micropozzetto rivestite di antigeni delle isole purificati. Il numero di strisce utilizzate in ogni saggio dipende dal numero di campioni da analizzare. Se si utilizzano tutte e 12 le strisce, questo test consente di analizzare un totale di 45 campioni di siero in duplicato.

NOTA IMPORTANTE – Portare tutti i reagenti, compresi i campioni sierici, a temperatura ambiente (25 °C) prima della seduta analitica. Temperature di incubazione con escursioni superiori a ± 1 °C possono compromettere i risultati.

1. Distribuire nel contenitore fornito il numero di strisce necessario alla seduta analitica. Fissare saldamente ogni striscia per evitare che possa cadere e frantumarsi.
2. Prendere conoscenza del sistema di numerazione dei pozzetti, A1, B1, C1, D1, ecc.
3. Dispensare 100 μ L di controllo negativo nei micropozzetti C1 e D1.
4. Dispensare 100 μ L di controllo positivo nei micropozzetti E1 e F1.
5. Dispensare 100 μ L di controllo riferimento nei micropozzetti G1 e H1
6. Aggiungere 100 μ L di campione sierico diluito (v. passaggio 4, Sezione 7 – Preparazione del reagente) ai pozzetti A2 e B2. Se si hanno più campioni, utilizzare un numero supplementare di strisce e aggiungere i campioni diluiti ai micropozzetti per esecuzione del test in duplicato. Ogni micropozzetto deve contenere 100 μ L di soluzione, esclusi A1 e B1 che rimangono vuoti in questa fase e saranno utilizzati successivamente.
7. Conservare le strisce non utilizzate nella busta sigillata contenente silicagel per una seduta analitica futura. Coprire accuratamente i micropozzetti non utilizzati con le strisce e conservarli per uso futuro.
8. Sigillare la piastra con la pellicola di plastica per impedire la contaminazione e incubare per un'ora a temperatura ambiente (25 °C \pm 1 °C).
9. Scaduto il periodo di incubazione, eliminare la soluzione in un lavandino facendola decantare rapidamente, quindi asciugare la piastra tamponandola delicatamente con carta assorbente. Se si utilizza un lavatore automatico per piastre, lavare tutti i pozzetti 3 volte con 300 μ L di soluzione di lavaggio. Se si utilizza un flacone morbido, riempire attentamente i pozzetti con il tampone di lavaggio e quindi svuotarli del contenuto. Ripetere questa procedura altre due volte e asciugare la piastra tamponandola con carta assorbente.
10. Aggiungere 100 μ L di reagente coniugato enzimatico ICA-IgG (v. passaggio 1, Sezione 7 – Preparazione del reagente) a tutti i pozzetti tranne A1 e B1.
11. Sigillare la piastra con pellicola di plastica e incubare per un'ora a temperatura ambiente (25 °C \pm 1 °C).
12. Dopo l'incubazione, ripetere la procedura di lavaggio (passaggio 9) e asciugare i micropozzetti con carta assorbente.
13. Aggiungere 100 μ L di substrato a tutti i pozzetti, compresi A1 e B1. Dispensare velocemente il reagente substrato senza esitazioni.
A volte il substrato può mostrare un colore giallastro. Questo colore non interferirà con i risultati del test.
14. Coprire la piastra e lasciarla al buio per 30 minuti a temperatura ambiente (25 °C \pm 1 °C).
15. Scaduti i 30 minuti, aggiungere 50 μ L di soluzione bloccante a ciascun pozzetto, con movimento rapido e deciso.
16. Impostare il lettore per micropiastre su 405 nm (come da istruzioni del produttore) e azzerarlo prendendo come riferimento il pozzetto A1 o B1.
17. Calcolare i dati in base ai principi esposti nella sezione 9.

9 CALCOLO DEI DATI

Registrazione delle letture rilevate per spettrofotometria (densità ottica in unità di assorbanza), come illustrato nell'esempio dei dati campione ICA (autoanticorpi delle isole pancreatiche). La lettura della densità ottica (OD) effettiva ottenuta nell'ICA appena condotto potrebbe differire da quanto riportato nell'esempio. Questo esempio è puramente illustrativo.

- Calcolare la lettura OD media dei campioni di riferimento, dei controlli negativo e positivo e del paziente effettuati in duplicato
 Lettura media del campione = $(1^a \text{ OD} + 2^a \text{ DO}) \div 2$
 (La OD media del Reference Control è R_m , la lettura media del controllo negativo è N_m , del controllo positivo è P_m e dei campioni è S_m .)
- Dividere l'OD media dei campioni e controlli per il valore. Si ottiene il valore di rapporto per ciascun campione: N_m/R_m ; P_m/R_m e S_m/R_m (= Ratio)

Interpretazione:

Valore rapporto ICA (ICA Ratio)	Risultato
< 0.95	Negativo
> 1.05	Positivo
0.95 – 1.05	Indeterminato (al limite)

Un valore < 0,95 indica un basso livello di anticorpi ICA, mentre un valore > 1,05 indica un alto livello di anticorpi ICA. I campioni con valori compresi tra 0,95 e 1,05 sono considerati indeterminati. In tal caso, si consiglia di ripetere i campioni indeterminati o di eseguirli in parallelo ad un nuovo campione prelevato in data successiva.

DATI CAMPIONE ICA ELISA

Sezione A: risultati del controllo

Dati				
Controlli	OD	OD media	Ratio	Risultato
Controllo riferimento	1.072 1.092	$R_m = 1.082$	1.00	
Controllo negativo	0.290 0.303	$N_m = 0.297$	0.27	Negativo
Controllo positivo	1.413 1.406	$P_m = 1.409$	1.3	Positivo

Nota: per la validità del test, il valore di rapporto deve essere $N_m < 0,95$ e $P_m > 1,05$
 Ripetere il test se i risultati non sono validi.

Sezione B: risultati del campione paziente

Dati				
Campione	OD	OD media	Ratio	Risultato
Controllo riferimento	1.072 1.092	$R_m = 1.082$	1.00	
1	1.444 1.472	$S_{1m} = 1.458$	1.35	Positivo
2	0.549 0.534	$S_{2m} = 0.541$	0.5	Negativo
3	1.036 1.051	$S_{3m} = 1.043$	0.96	Indeterminato

10 CONTROLLO QUALITÀ

La validità dei risultati è assicurata soltanto se parallelamente ai campioni sconosciuti vengono eseguiti i controlli positivo e negativo.

Il controllo negativo deve avere un valore $< 0,95$ mentre quello positivo $> 1,05$.

11 CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA

La specificità delle strisce ICA ELISA rivestite di antigene è stata stabilita sulla base di un'analisi condotta con tecnica Western blot utilizzando campioni confermati IgG-positivi agli antigeni delle isole pancreatiche. I campioni contenenti autoanticorpi tiroidei e fattori reumatoidi risultano negativi nell' ICA ELISA.

12 SIGNIFICATO CLINICO

Questo test in vitro rileva la presenza di autoanticorpi specifici dell'insulina nativa nel siero dei pazienti. I risultati ottenuti unicamente con l'uso di questa procedura non sono sufficienti per formulare una diagnosi dell'IDDM.

Conservare i campioni deboli positivi e al limite (entro 5% del Controllo riferimento OD) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analizzare nuovi campioni di questi pazienti almeno ogni 6 mesi utilizzando come riferimento i campioni sierici precedenti.

IL PRESENTE TEST È SOLAMENTE UN TEST DI SCREENING.

LA DIAGNOSI DELL'IDDM VA FORMULATA SULLA BASE DELL'ANAMNESI MEDICA DEL PAZIENTE, DEI SINTOMI CLINICI E DEI RISULTATI DI ALTRI TEST.

13 LIMITAZIONI E FONTI DI ERRORE

1. Benché un titer ICA più elevato produca una lettura OD maggiore, il test è stato studiato per la determinazione quantitativa di ICA soltanto.
2. Le cause di una scarsa riproducibilità sono da ricercarsi tra i fattori indicati di seguito.
 - a) Dispensazione incostante dei reagenti
 - b) Conservazione inadeguata dei reagenti
 - c) Ricostituzione erranea dei reagenti
 - d) Lavaggio incompleto dei micropozzetti
 - e) Reagente substrato scaduto o esposto alla luce
 - f) Spettrofotometro instabile o difettoso
 - g) Errore nella procedura di analisi

1 INTRODUCCIÓN Y USO PREVISTO

La diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) o diabetes tipo I es una enfermedad crónica debilitadora que afecta a la producción y secreción de insulina (una hormona clave) y altera el metabolismo del azúcar en la sangre. La insulina se sintetiza y se segrega en las células del islote o Islotes de Langerhans en el páncreas⁽¹⁾. La interrupción de la síntesis de la insulina está causada por la destrucción inmunológica de las células del islote por parte de autoanticuerpos en pacientes de DMID⁽²⁻⁴⁾. Tales alteraciones (autoinmunidad) pueden haberse heredado genéticamente y/o desencadenarse por exposición a productos químicos tóxicos, infecciones víricas y distintas formas de estrés⁽⁵⁾.

La DMID tiene una fase prediabética asintomática característica que puede durar hasta varios años. Durante este período, los individuos afectados presentan la fase temprana de menor secreción de insulina en respuesta la provisión de glucosa intravenosa u oral. En la mayoría de los casos, estas personas tienen autoanticuerpos contra células del islote (ICA) y/o autoanticuerpos contra la insulina (IAA) en la circulación. Los ICA se pueden detectar tempranamente, ocho años antes del inicio clínico de la DMID⁽⁶⁾ y por ello pueden servir como indicador temprano de la enfermedad o de la predisposición a ella. Las personas que dan positivo a ICA pueden manifestar una pérdida progresiva de la función de las células del islote tal como indica la interrupción de la secreción de insulina en la fase temprana. Cuando la secreción de insulina en la fase temprana se detiene totalmente, se desarrolla la DMID clínicamente⁽⁶⁾.

Los autoanticuerpos contra células del islote están presentes en el 70% de los pacientes con un inicio reciente de DMID^(13,14) comparado con el 0,1 - 0,5% de la población de control no diabética^(11,15). También se detectan ICA en parientes de primer grado de pacientes con DMID. Estas personas constituyen el segmento de población humana con mayor riesgo de desarrollar la DMID. Varios estudios concluyeron que los parientes de primer grado de pacientes con DMID que dan positivo en ICA desarrollan posteriormente la diabetes⁽¹⁶⁻¹⁹⁾. Otros estudios también sugieren que la presencia de ICA e IAA en el suero es un indicador de la alta probabilidad de desarrollar la DMID^(3,6-12). Por lo tanto, la detección serológica de ICA puede ser una potente herramienta para el diagnóstico temprano de la DMID. La trascendencia de estos autoanticuerpos como marcadores de la DMID también se pone de manifiesto por su presencia en personas no diabéticas que terminan desarrollando la DMID. Riley, et al. informaron recientemente que la determinación de ICA en pacientes con diabetes tipo 2 podía indicar la DMID antes del inicio de los síntomas clínicos y predecir la necesidad del tratamiento con insulina⁽²⁰⁾. Así, los pacientes a quienes inicialmente se diagnostica con diabetes tipo 2 y tienen ICA en el suero pueden empeorar en la dependencia de insulina.

Una detección temprana de ICA en la circulación es importante para identificar a las personas en la población general, hermanos y familiares de pacientes con DMID, que corren un mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad por su predisposición genética a la diabetes. En un congreso sobre ICA, se subrayó la necesidad inminente de un test ELISA para la determinación de la autoinmunidad contra células del islote⁽²¹⁾.

Actualmente, los ICA del suero se determinan por métodos indirectos de inmunofluorescencia e histoquímicos que utilizan como sustratos secciones de páncreas congeladas y sin fijar de humanos/primates o ratones. Pese a los intentos de mejorar y modificar este procedimiento desde su descripción original en 1974^(22,23), la técnica indirecta de inmunofluorescencia/histoquímica conlleva problemas metodológicos inherentes. Se ha demostrado que la estandarización de la técnica es muy difícil. La fiabilidad de esta técnica de "sección congelada" está limitada por factores como la variación de un páncreas a otro, la necesidad inevitable de tejido pancreático sin fijar y la disponibilidad poco frecuente del tejido adecuado.

ICA ELISA es un test ELISA cualitativo in vitro para la detección en la circulación de anticuerpos IgG contra antígenos de las células del islote pancreático.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Se inmoviliza una mezcla purificada de antígenos pancreáticos en micropocillos. Mediante un período de incubación, se permite a los anticuerpos en la muestra de suero que reaccionen a temperatura ambiente con las moléculas de antígeno en los micropocillos. Tras el lavado de sustancias del suero excedentes/sueltas, se añade un anticuerpo de cabra enzimático (fosfatasa alcalina), específico para las IgG humanas, al complejo antígeno-anticuerpos. Tras otro lavado a fondo, se añade un sustrato (PNPP) y el color generado se mide espectrofotométricamente. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de ICA en la muestra. Un control positivo en ICA sirve como control de calidad interno y garantiza unos resultados válidos.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Material de riesgo biológico potencial

La matriz de los calibradores y los controles es el suero humano. Se ha comprobado con reactivos autorizados por la FDA que el suero humano utilizado no es reactivo a HbsAg, anti-VIH 1/2 ni anti-HCV. Dado que no hay ninguna otra prueba que pueda ofrecer una garantía completa de la ausencia de los virus VIH, de hepatitis B u otros agentes infecciosos, estos reactivos deben considerarse potencialmente infecciosos.

2. Azida sódica

Algunos reactivos contienen azida sódica como conservante. La azida sódica puede reaccionar con el plomo, el cobre o el bronce y formar azidas metálicas explosivas. Al desechar estos materiales, enjuague siempre con abundante agua para evitar la acumulación de azidas.

3. Solución de parada

La solución de parada se compone de 1N de NaOH. Se trata de una base concentrada que debe manejarse con precaución. Puede provocar quemaduras, por lo que debe ponerse guantes. Es necesario llevar gafas y ropa protectora adecuada. Evite la inhalación. Diluya con agua cualquier derrame antes de utilizar toallas de papel para absorberlo.

4. Solución de sustrato

Solución de sustrato consiste de para-Nitrofenilfosfato (PNPP), un sustrato cromógeno non-proteicos usado en esta prueba de ELISA. En ocasiones, el sustrato puede mostrar un color amarillento. Este color no interferirá con los resultados de la prueba.

Precauciones

1. No congele los reactivos del test, guarde siempre todos los componentes a 2 °C - 8 °C.
2. Los controles positivos y negativos deben realizarse cada vez que se realice el test.
3. Use sólo suero claro como muestra para el test. La muestra del test no debe presentar turbiedad, hemólisis o contaminación microbiana.
4. Todas las muestras se analizarán en duplicado.
5. No mezcle reactivos de lotes diferentes.
6. No emplee reactivos caducados.
7. No permita que los reactivos queden a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo.
8. No exponga la solución de sustrato a la luz.
9. Es necesaria una cuidadosa técnica de pipeta para conseguir unos resultados reproducibles y exactos. referencia

4 REACTIVOS Y MATERIALES

Materiales suministrados:

1. PLA ICA	= Tiras de micropocillo con ICA (con soporte)	12 tiras
2. CONJ ENZ 6X	= Conjugado enzimático IgG antihumano ICA (conc)	2 x 1,0 mL
3. DIL SPE 5X	= Diluyente de muestra de ICA (concentrado)	1 x 25,0 mL
4. CONJ ENZ DIL	= Diluyente de conjugado	1 x 10,0 mL
5. CTRL REF ICA	= Control referencia ICA	1 x 1,5 mL
6. CTRL + ICA	= Control positivo ICA (suero humano)	1 x 1,5 mL
7. CTRL - ICA	= Control negativo ICA (suero humano)	1 x 1,5 mL
8. SUBS PNPP	= Solución de sustrato (PNPP)	1 x 15,0 mL
9. BUF WASH 25X	= Tampón de lavado (concentrado)	1 x 20,0 mL
10. SOLN STP	= Solución de parada (1N NaOH)	1 x 6,0 mL

5 MATERIALES ADICIONALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Toallitas de papel absorbente para secar las tiras tras el lavado y láminas de cierre/tapas de plástico para cubrir las tiras durante las incubaciones.
3. Tubos de cristal de tamaño adecuado para la dilución del suero.
4. Micropipetas con puntas desechables para dosificar 10 μ L, 50 μ L y 100 μ L.
5. Una lavadora de placa microtiter o una botella vertedora para el lavado.
6. Pipetas de 5 mL para la dosificación del diluyente de conjugado.
7. Un cilindro graduado de 500 mL.
8. Un lector de placas microtiter con 405 nm de capacidad de absorbencia.
9. Cinta de etiqueta plástica, para encintar los pocillos sin usar antes del ensayo.

6 RECOPIACIÓN DE MUESTRAS

Extraiga 5 - 10 mL de sangre por venipunción y viértalos en un tubo (parte superior roja). Se pueden usar separadores de suero. Separe el suero por centrifugación.

Las muestras de suero se pueden guardar a 2 °C - 8 °C.

La hemólisis excesiva y la presencia de grandes coágulos o crecimiento microbiano en la muestra del test puede repercutir en el rendimiento del test.

Congele la muestra de suero a -20 °C si no se puede analizar en un plazo de 24 horas.

7 PREPARACIÓN REACTIVA Y ALMACENAMIENTO

1. Reconstitución del conjugado enzimático ICA-IgG:

Vierta con exactitud 5 mL de diluyente de conjugado en una botella que contenga el conjugado enzimático ICA-IgG (concentrado). Cierre la botella y mezcle a fondo por inversiones.

Guarde el conjugado diluido a 2 °C - 8 °C cuando no se use. Registre la fecha de reconstitución en la etiqueta.

El reactivo diluido caduca a los 30 días tras la reconstitución.

Se proporcionan dos botellas que contienen concentrado de conjugado. Cada botella contiene suficiente conjugado para 6 tiras. Debe reconstituir según sea necesario.

2. Tampón del diluyente de la muestra:

Si precipitado está presente en el diluyente de muestra debido al almacenamiento en baja temperatura como 2 °C - 8 °C, disolver colocando el frasco en un baño de agua de 37 °C durante 30 minutos.

Vierta todo el contenido (25 mL) en 100 mL de agua destilada/desionizada en un contenedor adecuado.

Mezcle a fondo, etiquete el contenedor como Diluyente de muestra y guárdelo a 2 °C - 8 °C.

El reactivo diluido es estable hasta la caducidad que se muestra en el vial.

Nota que el precipitado en el concentrado produce ningún efecto en el rendimiento de la prueba y no estará presente en la 1X diluyente de muestra.

3. Solución de lavado:

Si el concentrado de amortiguador de lavado contiene cristales debido al almacenamiento a una temperatura menor, como podría ser 2 °C - 8 °C, disuélvalo colocando el vial en el baño María a 37 °C o en una incubadora durante 30 minutos.

Vierta todo el contenido en 480 mL de agua destilada/desionizada en un contenedor de 500 mL. Mezcle a fondo, etiquete el contenedor como "Solución de lavado" y guárdelo a 2 °C - 8 °C.

El reactivo diluido es estable hasta la caducidad que se muestra en el vial.

4. Preparación de la muestra de suero:

Con una pipeta, vierta exactamente 10 μ L (0,010 mL) de muestra de suero en 1,0 mL del diluyente de muestra de trabajo en un tubo de cristal ya etiquetado. Mezcle a fondo.

8 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El kit del test contiene 12 tiras de micropocillo recubiertas con antígenos de células del islote purificados. El número de tiras de micropocillo que se use en cada ensayo depende del número de muestras de suero que se van a examinar. Si se usan 12 tiras de micropocillo, se pueden hacer pruebas en duplicado en sueros de 45 pacientes con este kit.

NOTA IMPORTANTE: Guarde todos los reactivos, incluidas las muestras de suero, a temperatura ambiente (25 °C) antes de empezar el ensayo. Las temperaturas de incubación que varíen en más de ± 1 °C pueden afectar definitivamente a los resultados.

1. Reúna el número de tiras de micropocillo necesarias para el test en el soporte proporcionado. La tira de micropocillo debe asegurarse firmemente en su lugar o podría caerse y romperse.
2. Familiarícese con el sistema de indexación de los pocillos, p. ej., pocillo n.º A1, B1, C1, D1, etc.
3. Reparta **100 µL de control negativo** en los micropocillos C1 y D1.
4. Reparta **100 µL de control positivo** en los micropocillos E1 y F1.
5. Reparta **100 µL de control referencia** en los micropocillos G1 y H1.
6. Añada **100 µL de suero de muestra diluido** (véase n.º 4, Sección 7, Preparación del reactivo) en los micropocillos A2 y B2. Para las muestras del paciente adicionales, emplee tiras adicionales y añada otras muestras diluidas del paciente a los micropocillos duplicados. Debe haber 100 µL de solución en cada micropocillo que se va a testar, excepto en A1 y B1, que de momento están vacíos y que se usarán después.
7. Las tiras que no se usen deben guardarse correctamente con desecante en la bolsa ziplock que se proporciona para la siguiente prueba. Los pocillos que no se usen en la tira deben cubrirse correctamente y guardarlos para la prueba siguiente.
8. Proteja la placa con una cubierta de película o plástico (para prevenir su contaminación) y déjela durante **1 hora a temperatura ambiente (25 °C \pm 1 °C)**.
9. Tras la incubación, deseche la solución en la pila por decantación rápida y seque la placa dándole unos toques suaves con una toallita de papel. Si se utiliza una lavadora de placas automática, lave cada pocillo **3 veces con 300 µL (0,3 mL) de solución de lavado**. Si se utiliza una botella vertedora, llene los pocillos con la solución de lavado con cuidado y decante el buffer de los micropocillos. Repita el procedimiento dos veces más y seque la placa con una toallita de papel.
10. Añada **100 µL de reactivo conjugado enzimático ICA-IgG** (véase n.º 1, Sección 7, Preparación del reactivo) en todos los micropocillos excepto en los pocillos A1 y B1.
11. Proteja la placa con una cubierta de película o plástico y déjela a **temperatura ambiente (25 °C \pm 1 °C) durante una hora**.
12. Tras la incubación, **repita el paso del lavado** (paso n.º 9) y seque los micropocillos.
13. Añada **0,1 mL (100 µL) de solución de sustrato** a todos los micropocillos, incluidos los pocillos A1 y B1. Asegúrese de verter el reactivo de sustrato a un ritmo rápido y fijo sin interrupciones. En ocasiones, el sustrato puede mostrar un color amarillento. Este color no interferirá con los resultados de la prueba.
14. Cubra la placa y déjela a oscuras durante **30 minutos a temperatura ambiente (25 °C \pm 1 °C)**.
15. Pasados 30 minutos añada inmediatamente **50 µL de solución de parada** en cada pocillo a ritmo rápido y fijo sin interrupción.
16. Ajuste el lector de microplacas para que **lea la absorbencia a 405 nm** según las instrucciones del fabricante, y ponga en blanco el lector de placas con el pocillo A1 o B1.
17. Calcule los datos según lo indicado en la Sección 9.

9 CÁLCULO DE DATOS

Registrar las lecturas espectrofotométricas [densidad óptica (OD) en unidades de absorbencia] como se muestra en el ejemplo de los datos de muestra de autoanticuerpos contra células del islote (ICA). La lectura de OD real de su ICA ELISA puede que sea diferente. Esto sólo es un ejemplo.

1. Calcular el promedio de la lectura de OD de los controles de referencia, negativos y positivos y las muestras del paciente por duplicado.

Promedio de OD: Referencia (\bar{R}),
 Negativo (\bar{N}),
 Positivo (\bar{P}),
 Muestras (\bar{S})

2. Dividir el promedio de OD de las muestras y los controles por el valor \bar{R} . Esto da el valor del cociente de cada muestra.

Interpretaciones:

Valor del cociente ICA	Resultado
< 0,95	Negativo
> 1,05	Positivo
0,95 – 1,05	Indeterminado (Borderline)

Las muestras con valores de cociente < 0,95 muestran un *nivel bajo* de anticuerpos ICA; e
 l valor > 1,05 muestra un *nivel alto* de anticuerpos ICA.

Las muestras con valores entre 0,95 y 1,05 se consideran como *indeterminadas*. Se sugiere repetir las muestras indeterminadas o realizarlas en paralelo con una nueva muestra tomada en una fecha posterior.

Sección A: resultados de control

Datos			Valor del cociente	Resultado
Controles	OD	Prom. OD		
Ctrl. referencia	1,072 1,092	$\bar{R} = 1,082$	1,00	
Ctrl. negativo	0,290 0,303	$\bar{N} = 0,297$	0,27	Negativo
Ctrl. positivo	1,413 1,406	$\bar{P} = 1,409$	1,30	Positivo

Nota: Para que el test sea válido, valor del cociente $\bar{N} < 0,95$ y $\bar{P} > 1,05$
 Repita el test si los resultados no son válidos.

Sección B: Resultados de la muestra del paciente

Datos			Valor del cociente	Resultado
Muestra	OD	Prom. OD		
Ctrl. referencia	1,072 1,092	$\bar{R} = 1,082$	1,00	
1	1,444 1,472	$\bar{S}_1 = 1,458$	1,35	Positivo
2	0,549 0,534	$\bar{S}_2 = 0,541$	0,50	Negativo
3	1,036 1,051	$\bar{S}_3 = 1,043$	0,96	Indeterminado

10 CONTROL DE CALIDAD

Los controles negativos y positivos deben realizarse junto con muestras desconocidas cada vez para que los resultados sean válidos. El control negativo debe mostrar un valor de cociente $< 0,95$ y el control positivo debe mostrar un valor $> 1,05$.

11 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

La especificidad de las tiras de micropocillo impregnadas con antígeno se estableció mediante análisis de inmunotransferencia con muestras positivas confirmadas con IgG para antígenos de células del islote.

Las muestras con autoanticuerpos contra tiroides y factores reumatoides dan negativo en ICA ELISA.

12 TRASCENDENCIA CLÍNICA

Este procedimiento de test *in vitro* detecta la presencia de autoanticuerpos contra la insulina humana en sueros de paciente. Los resultados que se obtienen al utilizar únicamente este procedimiento no deben usarse para el diagnóstico de la DMID.

Guarde las muestras positivas débiles e indeterminadas (dentro del 5% del Control Referencia OD) y almacénelas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras recientes de estos pacientes deben volver a analizarse cada seis meses junto con las muestras de suero anteriores.

SÓLO ES UN TEST DE PROTECCIÓN. EL DIAGNÓSTICO DE LA DMID DEBE REALIZARSE A PARTIR DE LOS DATOS DEL HISTORIAL MÉDICO DEL PACIENTE, LOS SÍNTOMAS CLÍNICOS Y LOS RESULTADOS DE OTROS TESTS.

13 LIMITACIONES Y FUENTES DE ERROR

1. Aunque una disolución más alta de produciría una lectura de los datos de DO obtenidos superior, el test se ha diseñado para la determinación cualitativa de ICA sólo.
2. Una reproducibilidad insuficiente del test puede deberse a:
 - a. Una dosificación incorrecta de los reactivos
 - b. Un almacenamiento incorrecto de los reactivos
 - c. Una reconstitución incorrecta de los reactivos
 - d. Un lavado incompleto de los micropocillos
 - e. Un reactivo de sustrato viejo o expuesto a la luz
 - f. Un espectrofotómetro inestable o defectuoso
 - g. Un error en la realización del procedimiento de ensayo

1 INTRODUCTION ET APPLICATION

Le diabète de type 1 ou DID (diabète insulino-dépendant) est une maladie chronique débilitante qui entrave la production et la sécrétion d'une hormone essentielle, l'insuline et altère le métabolisme des glucides dans le sang. L'insuline est synthétisée et sécrétée par les cellules des îlots pancréatiques, appelés également îlots de Langerhans⁽¹⁾. L'interruption de la synthèse de l'insuline est due à la destruction immunologique des cellules des îlots par des auto-anticorps chez les patients atteints du diabète DID⁽²⁻⁴⁾. Ces anomalies (auto-immunité) peuvent être héritées génétiquement et/ou déclenchées par l'exposition à des produits chimiques toxiques, des infections virales et diverses formes de stress⁽⁵⁾.

Le diabète DID est caractérisé par une phase initiale asymptomatique (prédiabétique) qui peut durer plusieurs années. Pendant cette période, les individus atteints manifestent une diminution de la sécrétion d'insuline dans la phase précoce en réaction à une stimulation de glucose administré par voie intraveineuse et/ou orale. Dans la majorité des cas, ces individus transportent des auto-anticorps anti-cellules d'îlots (ICA) et/ou des auto-anticorps anti-insuline (IAA) circulants. Les ICA peuvent être détectés dès huit ans avant la manifestation clinique du DID⁽⁶⁾ et peuvent ainsi servir d'indicateur précoce de la maladie ou d'une prédisposition. Chez les individus qui sont ICA-positifs, une perte progressive de la fonction de la cellule de l'îlot peut apparaître, signalée par l'interruption de la sécrétion d'insuline en phase précoce. Quand cette sécrétion d'insuline en phase précoce s'arrête complètement, les symptômes cliniques évidents du DID se développent⁽⁶⁾.

Les auto-anticorps anti-cellules d'îlots sont présents dans 70 % des patients chez lesquels le DID^(13,14) est apparu récemment mais dans 0,1 à 0,5 % de la population témoin non-diabétique^(11,15). Les ICA sont également détectés chez les parents du premier degré des patients atteints de DID. Ces individus incluent le segment de la population humaine qui présente un risque élevé de développer le DID. Plusieurs études ont indiqué que les parents du premier degré de patients atteints du diabète DID, ICA-positifs, développaient par la suite un diabète⁽¹⁶⁻¹⁹⁾. D'autres études ont également suggéré que la présence d'ICA et d'IAA dans le sérum indique une susceptibilité accrue de développer le DID^(3,6-12). La détection sérologique des ICA peut donc fournir un puissant outil de diagnostic précoce du DID. La présence de ces auto-anticorps chez des individus non-diabétiques développant ensuite un DID démontre l'importance de leur rôle de marqueurs de cette maladie. Riley et d'autres chercheurs ont déclaré récemment que la détermination des ICA chez les patients atteints du diabète de type 2 permettait d'identifier un DID avant l'apparition des symptômes cliniques et de prédire la nécessité d'une thérapie à l'insuline⁽²⁰⁾. Ceci signifie que l'état des patients initialement diagnostiqués avec un diabète de type 2 et transporteurs d'ICA dans leur sérum risque de se dégrader en une dépendance à l'insuline.

Une détection précoce des ICA circulants est importante pour identifier les individus dans la population générale, les apparentés des patients DID, qui présentent un risque plus élevé de développer cette maladie en raison de leur prédisposition génétique au diabète. Un groupe international de travail sur les ICA a souligné le besoin imminent de recourir à un test ELISA pour déterminer l'auto-immunité contre les cellules des îlots⁽²¹⁾.

Actuellement, les ICA dans le sérum sont détectés par immunofluorescence indirecte et par des méthodes histochimiques sur des coupes de pancréas congelé libre d'humain ou de primate ou de rongeur, servant de substrats. Malgré diverses tentatives d'amélioration et de modification de cette procédure depuis sa première description en 1974^(22,23), la technique par immunofluorescence indirecte et/ou histochimique souffre de problèmes méthodologiques inhérents. Il s'est avéré très difficile de standardiser la technique. La fiabilité de cette technique avec « section congelée » est limitée par divers facteurs : les variations d'un pancréas à l'autre, la nécessité inévitable d'utiliser du tissu pancréatique non fixé et la difficulté de trouver le tissu adéquat.

ICA ELISA est un test ELISA qualitatif pour la détection in vitro des anticorps IgG circulants contre les antigènes des cellules des îlots pancréatiques.

2 PRINCIPE DU TEST

Un mélange purifié d'antigènes pancréatiques est fixé sur des micropuits. Pendant la période d'incubation, on laisse les anticorps dans l'échantillon de sérum réagir, à température ambiante, avec les molécules des antigènes sur les micropuits. Une enzyme (phosphatase alcaline) désignée comme un anticorps de chèvre, spécifique à l'IgG humaine, est ajoutée au complexe antigène-anticorps, après avoir éliminé, par lavage, le matériel de sérum excédentaire et/ou libre. Après un second lavage en profondeur, on ajoute un substrat (PNPP) et on mesure à l'aide d'un spectrophotomètre la couleur produite. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration en ICA dans l'échantillon. Un contrôle positif aux ICA sert de mesure de qualité interne pour garantir la validité des résultats.

3 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Risque biologique

Les étalons et contrôles sont constitués de sérum humain. Le sérum humain utilisé a été testé quant à l'absence d'anticorps HbsAg, anti-VIH 1/2 et anti-hépatite C avec des réactifs agréés par la FDA. Néanmoins, comme il n'existe aucune méthode d'analyse qui puisse totalement garantir l'absence de virus VIH, de l'hépatite B ou de tout autre agent infectieux, ces réactifs doivent être manipulés avec les précautions habituellement observées avec des échantillons présentant un risque biologique.

2. Azide de sodium

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. L'azide de sodium peut réagir avec le plomb, le cuivre ou le laiton pour former des azides métalliques explosifs. Après évacuation de ces produits dans les canalisations, faire couler l'eau abondamment afin d'éviter toute accumulation d'azide.

3. Solution blocante

La solution blocante est constituée de 1N NaOH. Il s'agit d'une base puissante qui doit être manipulée avec précaution. Il s'agit d'un acide puissant qui doit être manipulé avec précaution. Il peut causer des brûlures et doit être manipulé avec des gants. Porter une protection oculaire et des vêtements de protection appropriés. Éviter toute inhalation. Diluer tout acide déversé avec de l'eau avant de l'éponger au moyen de papier absorbant.

4. Solution de substrat

Solution de substrat se compose de para-Nitrophénylphosphate (PNPP), un substrat chromogène non protéique utilisé dans ce test ELISA. À l'occasion, le substrat peut parfois présenter une couleur jaunâtre. Cette couleur n'interférera pas avec les résultats du test.

Précautions

1. Ne pas congeler les réactifs du test, conserver toujours tous les éléments de la trousse à 2 °C - 8 °C.
2. Les contrôles positif et négatif doivent être utilisés chaque fois qu'un test est effectué.
3. N'utiliser que du sérum clair pour les spécimens de test. L'échantillon de test ne doit présenter aucune turbidité, hémolyse ni contamination microbienne.
4. Analyser tous les échantillons deux fois.
5. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots.
6. Ne pas utiliser de réactifs périmés.
7. Ne pas laisser des réactifs à la température ambiante pendant une longue période.
8. Ne pas exposer la solution de substrat à la lumière.
9. Une technique de pipetage minutieuse est essentielle pour obtenir des résultats reproductibles et précis.

4 RÉACTIFS ET MATÉRIEL

Matériel fourni :

1. PLA ICA	Bandelettes de micropuits ICA (avec le support)	12
2. CONJ ENZ 6X	Conjugué enzymatique ICA-IgG (concentré)	2 x 1,0 mL
3. DIL SPE 5X	Diluant pour l'échantillon (concentré)	1 x 25,0 mL
4. CONJ ENZ DIL	Diluant pour le conjugué	1 x 10,0 mL
5. CTRL REF ICA	Contrôle référence ICA	1 x 1,5 mL
6. CTRL + ICA	Contrôle positif ICA (sérum humain)	1 x 1,5 mL
7. CTRL – ICA	Contrôle négatif ICA (sérum humain)	1 x 1,5 mL
8. SUBS PNPP	Solution de substrat (PNPP)	1 x 15,0 mL
9. BUF WASH 25X	Tampon de lavage (concentré)	1 x 20,0 mL
10. SOLN STP	Solution blocante (1N NaOH)	1 x 6,0 mL

5 AUTRE MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

1. Eau distillée ou déminéralisée.
2. Papier absorbant pour égoutter les bandelettes après le lavage et emballages ou films plastiques pour les recouvrir pendant l'incubation.
3. Tubes en verre de dimension appropriée pour diluer le sérum.
4. Micropipette à extrémités jetables pour administrer 10 µL, 50 µL et 100 µL.
5. Laveur de microplaques ou flacon souple pour le lavage.
6. Pipettes de 5 mL pour administrer le diluant de conjugué.
7. Éprouvette cylindrique graduée de 500 mL.
8. Lecteur de microplaque ayant une capacité d'absorbance de 405 nm.
9. Étiquettes adhésives en plastique à apposer sur les puits non utilisés avant le dosage.

6 COLLECTE DE SPÉCIMENS

Prélever 5 – 10 mL de sang par ponction veineuse dans un tube sec (bouchon rouge). Il est possible d'utiliser des séparateurs de sérum. Séparer le sérum par centrifugation.

On peut conserver des échantillons de sérum à 2 °C - 8 °C.

Une hémolyse excessive et la présence de larges caillots ou de croissance microbienne dans le spécimen de test peuvent interférer avec son déroulement.

Congeler l'échantillon de sérum à -20 °C s'il ne peut être analysé en moins de 24 h.

7 PRÉPARATION ET CONSERVATION DU RÉACTIF

1. Reconstitution du conjugué enzymatique ICA-IgG :

Transférer avec précaution 5 mL de diluant de conjugué dans un flacon contenant le conjugué enzymatique ICA-IgG (concentré). Boucher le flacon et bien mélanger par retournements.

Conserver le conjugué dilué à 2 °C - 8 °C, en période de non-utilisation. Inscrire la date de la reconstitution sur l'étiquette.

Ce réactif dilué expire 30 jours après la reconstitution.

Deux flacons de concentré conjugué sont fournis dans la trousse. Chaque flacon contient une quantité de conjugué suffisante pour 6 bandelettes. Reconstituer selon les besoins.

2. Tampon de diluant pour l'échantillon:

Si précipité est présent dans diluant pour l'échantillon concentré en raison de conserver à basse température, comme les 2 °C - 8 °C, dissoudre en plaçant le tube dans un bain d'eau à 37°C pendant 30 minutes. Transférer tout le contenu (25 mL) dans un récipient approprié contenant 100 mL d'eau distillée ou déminéralisée. Mélanger soigneusement ; inscrire sur l'étiquette du récipient, Diluant échantillon et conserver à 2 °C - 8 °C. Le réactif dilué est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le tube. Notez que le précipité vu dans le concentré n'a aucun effet sur la performance du test et ne sera pas présent dans le 1X diluant de l'échantillon actif.

3. Solution de lavage :

Si des cristaux apparaissent dans cette solution après conservation à basse température, par exemple 2 °C - 8 °C, les dissoudre en plaçant la fiole dans un bain-marie ou un incubateur à 37 °C pendant 30 minutes.

Transférer tout le contenu dans un récipient approprié de 500ml rempli à 480 mL d'eau distillée ou déminéralisée. Mélanger soigneusement ; inscrire sur l'étiquette du récipient, Lavage et conserver à 2 °C - 8 °C.

Le réactif dilué est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le tube.

4. Préparation de l'échantillon de sérum :

Pipeter avec soin 10 µL (0,010 mL) de l'échantillon de sérum dans 1,0 mL de diluant de l'échantillon actif contenu dans un tube en verre préalablement étiqueté. Mélanger soigneusement.

8 PROCÉDURE DE DOSAGE

La trousse du test contient 12 bandelettes de micropuits recouvertes d'antigènes des cellules d'îlots purifiés. Le nombre de bandelettes de micropuits utilisé dans chaque dosage dépend du nombre d'échantillons de sérum à tester. Avec les 12 bandelettes de micropuits de cette trousse, il est possible de tester 45 sérums de patients, deux fois.

REMARQUE IMPORTANTE : Porter tous les réactifs, y compris les échantillons de sérum, à la température ambiante (25 °C) avant de commencer le dosage. Des différences de température d'incubation supérieures à ± 1 °C peuvent altérer les résultats de manière significative.

1. Regrouper le nombre de bandelettes de micropuits nécessaire pour effectuer le test dans le récipient fourni. Faire bien adhérer la bandelette au micropuits pour éviter qu'elle ne tombe et se brise.
2. Apprendre le système de désignation des puits, par exemple, puits n° A1, B1, C1, D1, etc.
3. Administrer **100 µL de contrôle négatif** dans les micropuits C1 et D1.
4. Verser **100 µL de contrôle positif** dans les micropuits E1 et F1.
5. Verser **100 µL de contrôle référence** dans les micropuits G1 et H1.
6. Ajouter **100 µL de sérum de l'échantillon dilué** (voir n° 4, Section 7, Préparation du réactif) aux micropuits A2 et B2. Si plusieurs échantillons de patients sont disponibles, utiliser des bandelettes supplémentaires et ajouter d'autres échantillons de patients dilués dans les micropuits, en double exemplaire. Il devrait y avoir 100 µL de solution à analyser dans chaque micropuits sauf dans les puits A1 et B1 qui, pour l'instant sont vides et seront utilisés ultérieurement.
7. Conserver toute bandelette non utilisée dans le sac à fermeture par glissière contenant un déshydratant, destiné au prochain test. Recouvrir et garder pour le prochain test tout puits non utilisé sur la bandelette.
8. Recouvrir la plaque d'un film ou emballage plastique (pour éviter la contamination) et incuber à **température ambiante (25 °C \pm 1 °C) pendant une heure.**
9. Après incubation, décanter rapidement la solution dans l'évier et égoutter la plaque sur du papier absorbant, en la secouant doucement.
En cas d'utilisation d'un laveur de plaques automatique, laver chaque puits 3 fois avec 300 µL (0,3 mL) de la solution de lavage.
En cas d'utilisation d'un flacon souple, remplir soigneusement les puits avec la solution de lavage puis décanter le tampon des micropuits. Répéter la procédure deux autres fois et égoutter la plaque sur du papier absorbant.
10. Ajouter **100 µL de réactif de conjugué enzymatique ICA-IgG** (voir n° 1, Section 7, Préparation du réactif) dans tous les micropuits sauf A1 et B1.
11. Recouvrir la plaque d'un film ou emballage plastique et la laisser reposer à **température ambiante (25 °C \pm 1 °C) pendant une heure.**
12. A la fin de l'incubation, **répéter l'étape de lavage** (étape n° 9) et égoutter les micropuits.
13. Ajouter **0,1 mL (100 µL) de solution de substrat** dans tous les puits, y compris les puits A1 et B1. Veiller à administrer le réactif de substrat à un rythme régulier et rapide sans interruption. À l'occasion, le substrat peut parfois présenter une couleur jaunâtre. Cette couleur n'interférera pas avec les résultats du test.
14. Recouvrir la plaque et la laisser dans l'obscurité pendant **30 minutes à température ambiante (25 °C \pm 1 °C)**.
15. Au bout de ces 30 minutes, ajouter rapidement **50 µL de la solution blocante** dans chaque puits en procédant à un rythme régulier et rapide sans interruption.
16. Configurer le lecteur de la microplaque pour **mesurer l'absorbance à 405 nm** selon les instructions du fabricant et remettre à zéro le lecteur avec le puits A1 ou B1.
17. Calculer les données conformément aux instructions de la section 9.

9 CALCUL DES DONNÉES

Enregistrez les relevés spectrophotométriques [la densité optique (DO) en unités d'absorbance] comme dans l'exemple des données-échantillons des autoanticorps anti-cellules d'îlots (ICA). S'agissant là d'un simple exemple, le relevé de la DO sur vos ICA ELISA peut s'avérer quelque peu différent.

1. Calculez le relevé de la DO moyenne des contrôles de référence, négatif et positif et des échantillons patient effectués en double.

DO moyenne : Référence (\bar{R}),
Négatif (\bar{N}),
Positif (\bar{P}),
Échantillons (\bar{S})

2. Divisez la DO moyenne des échantillons et des contrôles par la valeur \bar{R} . Vous obtenez ainsi la valeur d'un rapport pour chaque échantillon.

Interprétations :

Valeur du rapport ICA	Résultat
< 0,95	Négatif
> 1,05	Positif
0,95 – 1,05	Indéterminé (Limite)

Les échantillons avec des valeurs de rapport < 0,95 indiquent un *faible taux* d'autoanticorps anti-cellules d'îlots, et ceux avec des valeurs de rapport > 1,05 un *taux élevé*.

Les échantillons avec des valeurs de rapport contenues entre 0,95 et 1,05 sont considérés comme *indéterminés*. On suggère de répéter les échantillons indéterminés ou de les exécuter en parallèle à un nouvel échantillon obtenu à une date ultérieure.

EXEMPLES DE DONNÉES DE ICA ELISA

Section A : Résultats des contrôles

Données				
Contrôles	DO	DO moy.	Valeur du rapport	Résultat
Ctrl de référence	1.072	$\bar{R} = 1,082$	1,00	
	1.092			
Ctrl négatif	0.290	$\bar{N} = 0,297$	0,27	Négatif
	0.303			
Ctrl positif	1.413	$\bar{P} = 1,409$	1,30	Positif
	1.406			

Remarque : Pour un test valide, valeur du rapport, $\bar{N} < 0,95$ et $\bar{P} > 1,05$

Répétez le test en cas de non validité des résultats.

Section B : Résultats des échantillons patient

Données				
Échantillon	DO	DO moy.	Valeur du rapport	Résultat
Ctrl de référence	1.072	$\bar{R} = 1,082$	1,00	
	1.092			
1	1.444	$\bar{S}_1 = 1,458$	1,35	Positif
	1.472			
2	0.549	$\bar{S}_2 = 0,541$	0,50	Négatif
	0.534			
3	1.036	$\bar{S}_3 = 1,043$	0,96	Indéterminé
	1.051			

10 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Il importe que les contrôles négatif et positif soient exécutés avec des échantillons de valeur inconnue à chaque fois pour garantir la validité des résultats. Le contrôle négatif doit indiquer une valeur de rapport $< 0,95$, et le contrôle positif une valeur de rapport $> 1,05$

11 PERFORMANCES

La spécificité des bandelettes de micropuits ICA recouverts d'antigène a été établie par l'analyse Western blot à l'aide d'échantillons positifs confirmés pour l'IgG dirigée vers des antigènes de cellules d'îlots. La lecture des échantillons avec des auto-anticorps anti-thyroïde et des facteurs rhumatoïdes est négative sur le test ICA ELISA.

12 IMPORTANCE CLINIQUE

Cette procédure de test *in vitro* détecte la présence d'auto-anticorps anti-insuline humaine dans les sérums des patients. Les résultats obtenus à l'aide de cette procédure uniquement ne doivent pas être utilisés pour le diagnostic du DID.

Mettre de côté les échantillons limite et faiblement positifs (moins de 5 % du contrôle référence DO) et les conserver à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Des échantillons frais de ces patients doivent être analysés de nouveau tous les six mois ainsi que les échantillons de sérum précédents.

IL S'AGIT D'UN TEST DE DÉPISTAGE UNIQUEMENT. LE DIAGNOSTIC DU DID DOIT S'APPUYER SUR LES DONNÉES DE L'HISTORIQUE MÉDICAL DU PATIENT, LES SYMPTÔMES CLINIQUES ET LES RÉSULTATS D'AUTRES TESTS.

13 LIMITES ET SOURCES D'ERREUR

1. Même si un titre ICA plus élevé produit une lecture de DO plus élevée, le test est prévu pour la détermination qualitative de ICA seulement.
2. Une mauvaise reproductibilité des tests peut être due à :
 - a. une technique d'administration irrégulière des réactifs
 - b. une mauvaise conservation des réactifs
 - c. une mauvaise reconstitution des réactifs
 - d. un lavage incomplet des micropuits
 - e. un réactif de substrat trop usé ou exposé à la lumière
 - f. un spectrophotomètre instable ou défectueux
 - g. une erreur de procédure de dosage

14 LITERATURE

1. Orci, L., J. Vassali, and A. Parrelet (1988). The insulin factory. *Sci. Amer.*, 261:85-94.
2. Eisenbarth, G.S. (1985). Type I diabetes: A chronic autoimmune disease. *New Engl. J. Med.*, 314:1360-1368.
3. Eisenbarth, G.S., J. Connelly, and J.S. Soeldner (1987). The natural history of Type I diabetes. *Diabet./Metab. Rev.*, 3:873-891.
4. Etzioni, A. (1987). Immunological concepts in insulin-dependent (Type I) Diabetes Mellitus. *Immunol Res.*, 6:224-251.
5. Rossini, A.A., J.P. Mordes, and E.S. Handler (1989). A "Tumbler" hypotheses: The autoimmunity of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet. Spect.*, 2:195-201.
6. Soeldner, J.S. (1985). The prodermal phase of insulin-dependent diabetes. In: *Current Medical Literature - Diabetes*, 2:66-70.
7. Colman, P.G., R.C. Nayak, J. Connelly, A. Rabizadeh, J.S. Soeldner, and G.S. Eisenbarth (1986). Islet cell antibodies: Clinical utility and target antigens. In: *The Immunology of Diabetes Mellitus* (Jaworski, M.A. ed.). Elsevier, NY, 345-350.
8. Palmer, J.P. (1987). Insulin autoantibodies: Their role in pathogenesis of IDDM. *Diabet./Metab. Rev.*, 3:1005-1015.
9. Srikanta, S., A.T. Ricker, D.K. McCulloch, J.S. Soeldner, G.S. Eisenbarth, and J.P. Palmer (1986). Autoimmunity to insulin, beta cell dysfunction, and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 35:139-142.
10. Dean, B.M., F. Becker, J.M. McNally, A.C. Tarn, G. Schwart, E.A.M. Gale, and Bottazo, G.F. (1986). Insulin autoantibodies in the pre-diabetic period: correlation with islet cell antibodies and development of diabetes. *Diabetologia*, 29:339-342.
11. Irvine, W.J., R.S. Gray, and J.M. Steel (1980). Islet cell antibody as a marker for early stage Type I diabetes. In: *The immunology of diabetes* (Irvine, W.J., ed.), Teviot, Edinburgh, pp. 117-154.
12. Kamalesh, M., A. Karasik, and S. Srikanta (1986). Islet cell antibodies as predictors of insulin-dependent diabetes mellitus. *Pract. Cardiol.*, 12:79-91.
13. Irvine, W.J., C.J. McCallum, R.S. Gray, C.J. Campbell, J.J.P. Duncan, J.W. Faraquar, H. Vaughan, and P.J. Morris (1977). Pancreatic islet cell antibodies in diabetes mellitus correlated with duration and type of diabetes, coexistent autoimmune disease and HLA type. *Diabetes*, 26:138-147.
14. Landrum, R., G. Walker, A.G. Cudworth, C. Theophanides, D.A. Pyke, A.J. Bloom, and D.R. Gambler (1976). Islet cell antibodies in diabetes mellitus. *Lancet*, 2:1273-1276.
15. Riley, W. and N. MacLaren (1984). Islet cell antibodies are seldom transient. *Lancet*, 1:1351-1352.
16. Soeldner, J.S., M. Tuttleman, S. Srikanta, O.P. Ganda, and G.S. Eisenbarth (1985). Insulin-dependent diabetes and initiation of autoimmunity: Islet cell autoantibodies, insulin autoantibodies and beta cell function. *New Engl. J. Med.*, 313:893-900.
17. Battazo, G.F., R. Pujol-Barrell, and E. Gale. In: *The Diabetes Annual* (K.G.M.M. Alberti and L.P. Krall, eds.), Elsevier, NY, Oxford, 1:16-52.
18. Srikanta, S., O.P. Ganda, R.A. Jackson, R.E. Gleason, M.E. Kaldany, M.R. Garovoy, E.L. Milford, C.B. Carpenter, J.S. Soeldner, and G.S. Eisenbarth (1983). Type I diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive beta cell dysfunction. *Annals Int. Med.*, 99:320-326.
19. Srikanta, S., O.P. Ganda, A. Rabizadeh, J.S. Soeldner, and G.S. Eisenbarth (1985). First-degree relatives of patients with Type I diabetes mellitus: Islet cell antibodies and abnormal insulin secretion. *New Engl. J. Med.*, 313:461-464.
20. Riley, W.J., N.K. MacLaren, and J.H. Silverstein (1988). The predictability of insulin-dependent diabetes mellitus. *Adv. Pediatr.*, 35:167-187.
21. Boitard, C., E. Bonifacio, G.F. Bottazo, H. Gleichman, and J. Molenaar (1988). Immunology and diabetes workshop: Report on the third international (stage 3) workshop on standardization of cytoplasmic islet cell antibodies. *Diabetologia*, 31:451-452.
22. Bottazo, G.F., A. Florin-Christensen, and D. Doniach (1974). Islet cell antibodies in diabetes mellitus with polyendocrine deficiencies. *Lancet*, II:1279-1283.
23. Srikanta, S., A. Rabizadeh, M.A.K. Omar, and G.S. Eisenbarth (1980). Assay for islet cell antibodies: Protein A-monoclonal antibody method. *Diabetes*, 34:300-305.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité