

COD 44609 48 Tests
COD 44572 12 x 
BEI 2-8°C AUFBEWAHREN
Reagenzien zur qualitativen bestimmung von Anti-Inselzell-Antikörpern In-vitro-Diagnostikum für das klinische Labor

ANTI-ISLET CELL ANTIBODIES (AICA)



ANTI-INSELZELL-ANTIKÖRPER (AICA)

Indirekte Immunfluoreszenz
AFFENPANKREAS

METHODENPRINZIP

Anti-Inselzell-Antikörper (AICA) im Serum binden an die entsprechenden Antigene im Gewebeschnitt des Affenpankreas. Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden mittels Fluorescein-markierten Antikörpern gegen humanes Immunglobulin nachgewiesen und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht.¹

INHALT

CODE 44609	
A. Objektträger	12 x 4 Felder
B. PBS (10x)	1 x 100 mL
C-. Kontrolle negativ	1 x 0,3 mL
D. IgG FITC/Evans (M)	1 x 3,5 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL
F. Blotting-Papier	1 x 12

CODE 44572	
A. Objektträger	12 x 4 Felder

ZUSAMMENSETZUNG

- A. Objektträger. Jedes Feld enthält einen Gewebeschnitt des Affenpankreas (MP).
- B. PBS (10x). Natriumphosphat 112,5 mmol/L, Kaliumphosphat 30 mmol/L, Natriumchlorid 1,15 mol/L, Natriumazid 0,95 g/L, pH-Wert 7,2.
- C-. Kontrolle negativ: Humanserum, Natriumazid 0,95 g/L.
- D. IgG FITC/Evans (M). Antikörper von der Ziege, Human-Anti-Immunglobuline IgG konjugiert mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), adsorbiert mit Affenserum. Evans Blau 0,01 g/l und Natriumazid 0,95 g/l.
- E. Mounting Medium. Eindeckmedium: Mowiol 12%, Glycerol 30%, Tris 20 mmol/L, Natriumazid 0,95 g/L.
- F. Blotting-Papier.

Die für die Herstellung der positiven und negativen Kontrollen verwendeten Humansenen wurden getestet und in Bezug auf die Anwesenheit von Anti-HIV- und Anti-HCV-Antikörpern sowie von HBs-Antigenen für negativ befunden. Dennoch sollten die Kontrollen mit Vorsicht und als potentiell infektiös behandelt werden.

F LAGERUNG

Bei 2-8 °C aufbewahren.

Die Reagenzien bleiben bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil, sofern sie fest verschlossen gelagert werden und eine Kontamination während ihrer Anwendung vermieden wird.

Anzeichen für Verfall:

- Flüssige Bestandteile: Vorhandensein von Partikeln, Trübung.
- Objektträger: Eingerissene Folienpackung, makroskopisch sichtbare Defekte am Gewebeschnitt, wie Kratzer oder eine sich ablösende Zellschicht.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN

- B. PBS (10x).
- D. IgG FITC/Evans (M).
- E. Mounting Medium. Eindeckmedium.
- C+. AICA-Kontrolle positiv. Humanserum mit anti-Inselzell-Antikörpern, Natriumazid 0,95 g/L.
- C-. Kontrolle negativ.

REAGENZENVORBEREITUNG

PBS: Verdünnen Sie Reagenz B im Verhältnis von 1:10 mit destilliertem Wasser. Bei 2-8°C bleibt es eine Woche stabil.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE AUSRÜSTUNG

- Feuchte Kammer
- Waschküvette
- Deckgläser 24 x 60 mm
- Fluoreszenzmikroskop mit einem Anregungsfilter von 495 nm und einem Emissionsfilter von 525 nm zum Sichtbarmachen der FITC-Markierung.

PROBEN

Mit gebräuchlichen Verfahren gewonnenes Serum oder Plasma. Bei 2-8 °C bleibt es eine Woche stabil.

Verdünnen Sie die Proben vor dem Test im Verhältnis von 1:4 mit PBS (siehe Reagenzienvorbereitung).

Zur Titration positiver Proben verdünnen Sie diese in einer Verdünnungsreihe jeweils zweifach, beginnend mit einem Verhältnis von 1:4 mit PBS.

VERFAHREN

1. Bringen Sie die Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur.
2. Geben Sie auf jedes Feld des Objektträgers einen Tropfen (50 µL) der verdünnten Probe oder der Kontrolle. Achten Sie darauf, dass das Feld vollständig bedeckt ist (Anmerkung 1).
3. Inkubieren Sie den Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur (15-30°C) in der feuchten Kammer.
4. Zum Entfernen von Probentropfen klopfen Sie vorsichtig gegen den geeigneten Objektträger. Vermeiden Sie dabei eine Kreuzkontamination der Seren.
5. Spülen Sie den Objektträger vorsichtig mit PBS ab (siehe Reagenzienvorbereitung sowie Anmerkung 2).
6. Waschen Sie den Objektträger 5 Minuten lang gründlich in einer mit PBS gefüllten Waschküvette. Wechseln Sie das PBS und wiederholen Sie das Waschen.
7. Tupfen Sie die Objektträger zum Entfernen der Flüssigkeit vorsichtig mit dem mitgelieferten Blotting-Papier ab. Die Gewebeschnitte müssen jedoch während des Verfahrens feucht gehalten werden.
8. Geben Sie auf jedes Feld einen Tropfen Reagenz D. Inkubieren Sie den Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur (15-30°C) in der feuchten Kammer.
9. Wiederholen Sie die Schritte Waschen (6) und Abtupfen (7).
10. Geben Sie auf jedes Feld einige Tropfen Reagenz E und decken Sie den Objektträger mit einem Deckglas ab, ohne dabei Luftblasen einzuschließen.

AUSWERTUNG

Werten Sie den Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop (250-400x) aus. Die besten Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn die Auswertung der Objektträger sofort erfolgt. Wählen Sie dazu einen mittig gelegenen Ausschnitt des Gewebeschnitts, da die Fluoreszenzintensität an dessen Rand für die Präparation nicht repräsentativ ist.

Seren, die in der empfohlenen Verdünnung eine intrazelluläre Färbung mit granularer Struktur der Inselzellen zeigen, gelten als positiv.

Positive Seren können austriert werden.

Wenn keine der spezifischen Färbungen zu erkennen sind, sollte das Ergebnis als negativ für diese Autoantikörper angesehen werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Positivkontrolle (C+) und die Negativkontrolle (C-) müssen gleichzeitig mit den vom Patienten entnommenen Proben ausgeführt werden, um die Funktionsfähigkeit des Untersuchungsverfahrens nachzuweisen.

Die Kontrolle positiv (C+) sollte die oben beschriebene spezifische Färbung ergeben.

Die Kontrolle negativ (C-) darf keine spezifische Färbung ergeben.

Jedes Labor sollte ein internes Protokoll für die Qualitätskontrolle sowie Maßnahmen zur Fehlerbehebung für den Fall festlegen, dass die Kontrollergebnisse nicht innerhalb der zulässigen Toleranzgrenzen liegen.

TESTEIGENSCHAFTEN

- Das Konjugat IgA FITC/Evans (M) ist gegenüber dem Normal der WGO mit FITC-markierten Human Anti-Immunglobulinen IgG vom Schaf kalibriert.
- Die mit dem Kit AICA von BioSystems in einer vergleichenden Studie erhaltenen Ergebnisse mit Reagenzien zur Bestimmung von Antikörpern Anti-GAD und Antikörpern Anti-IA2 zeigten eine gute Übereinstimmung.
- Die Spezifität der AICA-Kontrolle positiv wurde mit einem internen Referenzserum überprüft.

DIAGNOSTISCHE EIGENSCHAFTEN

Die indirekte Immunfluoreszenz ist eine gebräuchliche Methode zur Bestimmung von Antikörpern und Antizellen in den Inseln der Bauchspeicheldrüse (AICA). Diese Antikörper sind stark mit insulinabhängigem Diabetes mellitus assoziiert^{2,3}. Der Kit von BioSystems Anti-Körper Anti-Zellen der Inseln der Bauchspeicheldrüse (AICA) wurde zur Untersuchung von 128 Seren eingesetzt, 78 Patienten mit Diabetes mellitus Typ I und 50 Spender der Blutspendebank. Die Ergebnisse zeigten eine Empfindlichkeit und diagnostische Spezifität von 65% bzw. 100%.

Die klinische Diagnose sollte nicht nur anhand eines einzigen Testergebnisses, sondern der Gesamtheit der klinischen Befunde und Laborergebnisse gestellt werden.

ANMERKUNGEN

1. Vermeiden Sie es, die auf den Feldern fixierten Gewebeschnitte während der Durchführung des Verfahrens zu berühren.
2. Um beim Waschen der Objektträger eine Kreuzkontamination zwischen benachbarten Proben zu vermeiden, empfiehlt sich die Verwendung einer Spritzflasche oder Pipette.

LITERATUR

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. In: Methods in Nonradioactive Detection. Hrsg. Howard GC. Appleton & Lange, 1993.
2. Lipton R, LaPorte RE. Epidemiology of islet cell antibodies. Epidemiologic Reviews 1989; 11:182-203.
3. Hagopian WA, Lernmark A. Islet Cell Autoantibodies. In: Autoantibodies. Hrsg. James B. Peter und Yehuda Schoenfeld. Elsevier, 1996.