

# TEST DE DETECTION DES ANTICORPS ANTI-ILOTS (ICAc)

REF

IMM 1123-40



## Cellules pancréatiques de singe

### UTILISATION DU TEST

Ce test en Immunofluorescence Indirecte est utilisé pour la détection et la titration semi-quantitative d'anticorps anti-cellules d'îlots dans le sérum humain, en vue du diagnostic du diabète insulino-dépendant de type 1.

### RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Le diabète est une maladie chronique et métabolique complexe influencé par divers facteurs héréditaires et environnementaux qui résulte de l'incapacité de l'organisme à maintenir l'utilisation des glucides, lipides et protéines.

La maladie, caractérisée par un haut niveau de glucose dans le sang, est causée par une production d'insuline insuffisante ou une déficience de l'utilisation de l'insuline. La plupart des cas de diabète sont répartis dans deux catégories cliniques : le diabète insulino-dépendant (de type 1) et le diabète non-insulino-dépendant (de type 2).

Le pronostic, le traitement et la gestion de la maladie sont différents pour chaque type. Il est décrit que le diabète de type 1 est une maladie auto-immune ciblée sur les cellules-β des îlots de Langerhans du pancréas. Les antigènes comme l'acide glutamique décarboxylase (GAD), ICA-512 et l'insuline sont les cibles antigéniques des îlots qui provoquent une réaction auto-immune. Ils ont été décrit comme des marqueurs fortement prédictifs, en particulier s'ils sont présent à des titres élevés<sup>(1,15)</sup>. La détection de ces anticorps anti-cellules d'îlots par immunofluorescence indirecte (IF) dans le substrat pancréatique est considérée comme la technique de référence pour le diagnostic du diabète insulino-dépendant<sup>(16,17)</sup>. Ces anticorps cytoplasmiques anti-cellules d'îlots sont normalement utilisés pour la prédiction de diabète du type 1<sup>(18,20)</sup>.

Les anticorps anti-cellules d'îlots sont détectés chez plus de 90% des patients diabétiques nouvellement diagnostiqués. L'étude de la famille Bart's Windsor, montre que 100% des parents des patients atteints de diabète insulino-dépendant (avec un taux d'anticorps >80JDF unité) ont progressé vers un diabète insulino-dépendant dans les 10 ans.

Le taux d'anticorps anti-cellules d'îlots est plus élevé au début du diabète de type 1 et diminue ensuite progressivement<sup>(12,18)</sup>. Les anticorps anti-cellules d'îlots ont des spécificités différentes et montrent deux types de réactivité. Le premier modèle est principalement restreint aux cellules β. Les deuxièmes colorent les cellules d'îlots et correspondent au modèle de fluorescence classique des anticorps anti-cellules d'îlots cytoplasmiques.

### PRINCIPE DU TEST

Les anticorps anti-îlots sont détectés par immunofluorescence indirecte (IF). Dans cette méthode, les sérums des patients sont incubés sur des coupes de pancréas de singe pour permettre la fixation des anticorps présents au substrat. Tout anticorps non fixé sera éliminé par lavage. Les anticorps fixés de classe IgG sont détectés par incubation avec des conjugués marqués à la fluorescéine. Les réactions sont observées sous un microscope à fluorescence équipé de filtres appropriés. La présence d'anticorps anti îlots est traduite par une fluorescence vert-pomme du cytoplasme des îlots de Langerhans. Le titre (l'inverse de la dilution la plus élevée encore positive) est alors déterminé en testant des dilutions successives du contrôle positif<sup>(21)</sup>.

### MATÉRIEL FOURNI

Lames de pancréas de singe SORB   SLD   4	10 x 4 puits
Contrôle positif d'anticorps anti-îlots : sérum humain contenant des anticorps anti-îlots, standardisé par rapport au sérum de contrôle positif de référence JDF (Juvenile Diabetes Foundation). <b>JDF est indiqué sur l'étiquette du flacon.</b> Prêt à l'emploi CONTROL   +	1 x 0,5 ml
Contrôle négatif (contient un conservateur <0,1% d'azide de sodium) Prêt à l'emploi CONTROL   -	1 x 0,5 ml
Conjugué IgG de chèvre anti-humaine marquée à la FITC, spécifique des chaînes lourdes (contient un conservateur <0,1% d'azide de sodium). <b>A protéger de la lumière.</b> Prêt à l'emploi CONJ   FITC   IgG	1 x 5 ml
Conjugué B (contient un conservateur <0,1% d'azide de sodium) - <b>A protéger de la lumière.</b> Prêt à l'emploi CONJ   FITC   B	1 x 5 ml
Diluant échantillon (contient un conservateur <0,1% d'azide de sodium) Prêt à l'emploi DIL   SPE	1 x 60 ml
Tampon phosphate salin (PBS) - Dissoudre chaque flacon pour obtenir un litre. A reconstituer BUF   WASH   RCNS   1L H <sub>2</sub> O	2 flacons
Milieu de montage (contient un conservateur <0,1% d'azide de sodium). <b>Ne pas congeler.</b> Prêt à l'emploi MM	1 x 5 ml
Contre-colorant Bleu d'Evans Prêt à l'emploi EVAN'S BLUE	1 x 1 ml
Lamelles couvre-lames	12

## MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

---

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Bac à coloration (par exemple : Jarre de Coplin)
- Tubes à essai (13 x 75 mm) et portoir de tubes à essai
- Eau distillée ou désionisée
- Eprouvette graduée 1L
- Flacon pour solution de lavage
- Papier absorbant
- Chambre d'incubation

## STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

---

Conserver tous les réactifs entre +2°C à +8°C.

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Laisser revenir à température ambiante avant utilisation.

## PRÉCAUTIONS

---

Tous les composants d'origine humaine ont été dépistés et révélés négatifs pour l'antigène HBs et pour les anticorps anti-VIH 1 et 2, ainsi que HCV et HTLV-I par les tests recommandés par la FDA. Cependant, du fait qu'aucun test connu ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage<sup>(22)</sup>.

**ATTENTION :** Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium. Ce composé peut réagir avec les canalisations en plomb ou en cuivre et former des sels d'azides métalliques explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer abondamment les canalisations avec de l'eau afin d'éviter toute accumulation de résidus. L'azide de sodium est un poison et peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, signaler immédiatement l'incident au directeur du laboratoire ou à un centre antipoison. Le protocole doit être suivi scrupuleusement afin de garantir des résultats valides. Ne pas substituer les composants du coffret par d'autres réactifs provenant d'autres coffrets. Ne pas utiliser de coffret ayant dépassé la date de péremption indiquée sur l'emballage.

## ÉCHANTILLONS

---

Seuls les sérums peuvent être utilisés dans ce protocole.

Des sérums hémolysés, lipémiques ou contaminés peuvent interférer sur les performances de ce test et ne doivent pas être utilisés.

Les sérums peuvent être conservés pendant une semaine entre +2°C/+8°C. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Éviter les congélations/décongélations successives des sérums.

## PROCÉDURE DU TEST

---

### A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1/5 dans le diluant échantillon fourni (0,1 ml de sérum + 0,4 ml de diluant). Le dépistage de plus d'une dilution aide à éviter les « phénomènes de zone ». Pour le dépistage, **NE PAS diluer les contrôles positif et négatif**. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des autoanticorps dans le cas où le dépistage sera trouvé positif.

2. Laisser revenir à température ambiante les lames pendant **10 à 15 minutes**. Ouvrir le sachet et ôter délicatement les lames sans toucher le substrat.

3. Identifier les lames et les placer dans la chambre d'incubation dont le fond aura été tapissé de papier absorbant humide.

4. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer **1 goutte** (≈50 µl) du contrôle négatif dans le puits n°1. De la même façon, déposer 1 goutte du contrôle positif dans le puits n°2. Éviter le remplissage excessif des puits.

5. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer **1 goutte** du sérum dilué du patient (≈50 µl) dans les autres puits. Éviter le remplissage excessif des puits.

6. Placer les lames dans la chambre d'incubation et incuber pendant **18-24 heures à +2°C/+8°C**.

7. Retirer une lame de la chambre d'incubation. Tenir la lame par l'extrémité de l'étiquette et rincer délicatement à l'aide d'une pipette contenant approximativement **10ml** de PBS, ou rincer la lame dans un bécher rempli de PBS. Ne pas utiliser de bouteille de lavage. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter le processus avec les lames restantes.

8. Retirer une lame du bac à coloration. Enlever l'excès de PBS en épongeant le bord de la lame avec du papier absorbant. Placer la lame dans la chambre d'incubation. Retourner immédiatement le flacon compte-gouttes du **conjugué IgG de chèvre anti-humaine marquée à la FITC** et presser pour appliquer **1 goutte** (≈50 µl) dans chaque puits. Répéter les étapes 7 et 8 avec les lames restantes.

9. Recouvrir la chambre d'incubation et laisser incuber **30 minutes** à température ambiante.

10. Recommencer les **étapes 7-8-9** en utilisant à l'étape 8 le **conjugué B**.

11. Sortir une lame de la chambre d'incubation. Plonger la lame dans un bécher contenant du PBS pour éliminer tout excès de conjugué. Transférer la lame dans un bac à coloration et laver pendant **10 minutes**. Répéter le processus avec les lames restantes.

Eventuellement, **2 à 3 gouttes** de contre-colorant Bleu d'Evans peuvent être ajoutées au dernier lavage.

**REMARQUE :** *Un mauvais lavage peut amener une augmentation de la fluorescence de fond.*

12. Ôter une lame de la cuve à coloration. Eponger le bord de la lame à l'aide d'un papier absorbant pour enlever l'excès de PBS. **Lorsque la lame est encore humide monter la lamelle**. Mettre **3 gouttes** de milieu de montage également réparties sur la lamelle et retourner la lame sur la lamelle. Appliquer délicatement une pression sur le bord de la lamelle pour enlever toutes bulles d'air. Éviter tout mouvement de la lamelle. Recommencer le processus avec les lames restantes.

13. Examiner la fluorescence spécifique sous microscope à fluorescence à un grossissement x200 ou plus. Les lames doivent être lues immédiatement. Cependant, la présence d'un inhibiteur d'extinction de fluorescence dans le milieu de montage permet une lecture retardée sans perte significative d'intensité de fluorescence. Dans ce cas, les lames devront être conservées à l'obscurité à +2°C/+8°C.

## B. Détermination final : Titration

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les **étapes 5 à 13** pour déterminer son titre. Chaque test doit inclure le contrôle négatif non dilué et le contrôle positif **pur** et dilué au **1/2, 1/4, 1/8 et 1/16**.

Préparer une série de dilution de raison 2, des sérums de patients en commençant au 1/5. L'inverse de la plus grande dilution qui produit la réaction positive, est le titre. Si le titre du contrôle positif est inclus dans les limites définies par les caractéristiques du QC, les quantités d'anticorps dans le sérum du patient peuvent alors être converties en unité JDF<sup>(16)</sup>. Les unités JDF du contrôle positif sont indiquées sur l'étiquette du flacon du contrôle positif. Pour calculer l'unité JDF du sérum inconnu, diviser simplement le titre du patient par le titre du contrôle positif, puis multiplier par l'unité JDF du contrôle positif de l'étiquette.

### Exemple :

Le titre du contrôle positif est 1/4

Le titre de l'échantillon du patient est 1/10




L'unité en JDF lu sur l'étiquette du contrôle positif est 160 en unité JDF.

### Calcul :

Concentration en ICAC	=	$\frac{10}{4}$	x	160	=	400 en unité JDF
-----------------------	---	----------------	---	-----	---	------------------

## C. Préparation de la série de dilution

Pour chaque sérum positif d'anticorps anti-cellules d'îlots lors du dépistage, numéroter quatre tubes 1 à 4 et ajouter 0,4 ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0,2 ml dans les tubes suivants. Introduire à la pipette 0,1 ml de sérum non dilué dans le tube 1 et bien mélanger. Transvaser 0,2 ml du tube 1 au tube 2 et bien mélanger. Continuer à transvaser 0,2 ml d'un tube à l'autre après avoir mélangé afin d'obtenir les dilutions prévues comme décrit dans le tableau suivant :

Tubes	1	2	3	4
Sérum	0,1 ml +			
Diluant échantillon	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Transfert				
Dilution finale	1/5	1/10	1/20	1/40

## CONTROLE DE QUALITÉ

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série.

Le contrôle négatif ne doit présenter aucune fluorescence des cellules d'îlots.

Le contrôle positif doit présenter une fluorescence du cytoplasme des cellules d'îlots.

Lors de la titration du contrôle positif, un titre final  $\pm$  de la dilution de raison 2 du titre indiqué doit être obtenu. Si les résultats attendus ne sont pas obtenus, recommencer la manipulation.

Si de mauvais résultats continuent avec les contrôles, ceux-ci peuvent être dus à :

- La turbidité. Des contrôles présentent un trouble (=contamination). Ecarter le contrôle et utiliser un autre contrôle.
- Des problèmes avec le système optique du microscope à fluorescence comme par exemple : un mauvais alignement, durée de vie de l'ampoule dépassée, etc...
- Un assèchement des lames pendant la manipulation
- Une mauvaise préparation des séries de dilutions du contrôle.

## RÉSULTATS

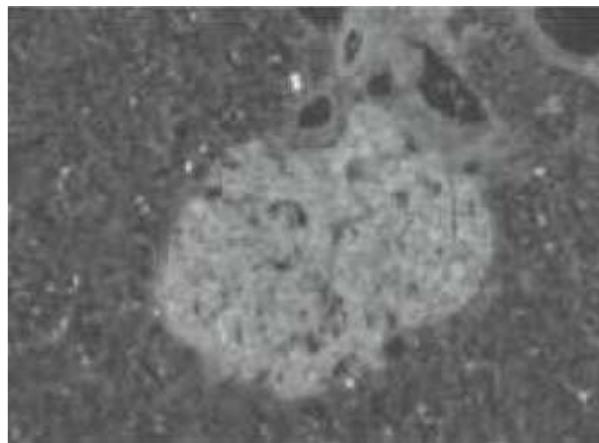
Les résultats des tests d'anticorps de cellules d'îlots sont rendus négatifs (si <5) ou positifs avec le titre ou l'unité JDF<sup>(8)</sup>.

Lire spécifiquement la fluorescence du cytoplasme des cellules d'îlots de Langerhans ; d'autres sortes d'anticorps peuvent être observés sur les coupes de pancréas comme les anticorps antinucléaires (ANA), les anticorps mitochondriaux (AMA), et les anticorps anti-muscle lisse (ASMA). Les sérums ne présentant **aucune de ces réactions** ou aucune fluorescence seront rendus négatifs.

Tout sérum présentant une **fluorescence nucléaire** devra être testé avec le test d'Anticorps Antinucléaires (ANA) sur cellules HEP-2 ou le test d'Anticorps Antinucléaires (ANA) sur coupe de foie de souris.

Tout sérum présentant une **fluorescence AMA ou ASMA** devra être testé sur une coupe rein-estomac-foie de rat.

**REMARQUE** les réactions des anticorps anti-cellules d'îlots, par leur nature, sont beaucoup plus faibles que les réactions ANA ou d'autres réactions immunofluorescentes autoanticorps.



Fluorescence spécifique du cytoplasme de cellules d'îlots de Langerhans

## LIMITES DE LA PROCÉDURE

Dans certains cas, des anticorps de plusieurs affinités (surtout ANA) peuvent être détectés. Ils peuvent empêcher la détection des anticorps anti-cellules d'îlots.

Dans certains cas, la titration du sérum permettra la visualisation des anticorps anti-cellules d'îlots.

Dans d'autres cas, si le titre est plus faible que celui des ANA ou d'autres anticorps, on peut ne pas les détecter. Ne pas utiliser des sérums hémolysés ou lipémiques ou contaminés.

Ce test s'utilise sur sérum humain seulement.

## VALEURS ATTENDUES

Approximativement 50 à 80% des diabètes primaires sont positifs en anticorps anti-cellules d'îlots.

La présence d'anticorps anti-cellules d'îlots chez les parents non diabétiques de premier degré et chez les sujets normaux non diabétiques est respectivement de 2 à 5% et de 0,25 à 1,7%<sup>(5,16)</sup>.

Environ 11% des parents de premier-degré ayant des anticorps anti-cellules d'îlots développent le diabète chaque année. Un intervalle de 8 ans entre la détection des anticorps anti-cellules d'îlots et le début du diabète a aussi été décrit.











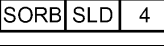
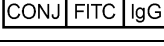
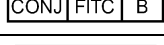
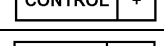
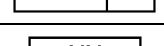
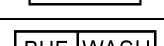
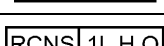
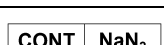
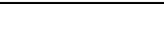
### Incidence d'anticorps anti-cellules d'îlots

Groupe de maladie	Age (années)	Nombre de patients examinés	% Positif
<b>Diabète de type 1 (IDDM)</b>			
<b>Au début</b>	<1-10	19	63
	11-20	25	60
	21-40	8	25
<b>Longue date</b>	<1-10	22	41
	11-20	71	39
	21-40	26	24
	41-70	13	0
	71-80	3	33
<b>Diabète de type 2 (IDDM)</b>			
<b>Au début</b>	<1-40	0	-
	41-80	39	3
<b>Longue date</b>	<1-10	0	-
	11-20	5	20
	21-80	75	1
<b>Parents de premier degré non diabétiques</b>			
	<1-30	61	0
	31-50	119	2
	51-80	19	0
<b>Contrôles non diabétiques</b>			
	>18	200	0

## RÉFÉRENCES

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

## LÉGENDE DES SYMBOLES

	Risque Biologique
	Lire les instructions d'utilisation
	Nombre de tests
	Référence produit
	Numéro de lot
	Date d'expiration
	Température limites de conservation
	Pour le diagnostic <i>in vitro</i> uniquement
	Conforme à la réglementation CE
	Test en immunofluorescence indirecte
	Lame de 4 puits
	Conjugués immunofluorescents
	
	Contrôle positif
	Contrôle négatif
	Milieu de montage
	Solution de lavage
	A reconstituer avec 1L d'eau distillée
	Contient de l'azide de sodium

## SCHÉMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

### Recherche d'anticorps anti-cellules d'îlots

	Opérations à effectuer	Temps d'incubation
Incubation des sérums	<ul style="list-style-type: none"><li>Sortir la lame de son emballage, la placer dans la chambre humide.</li><li>Déposer rapidement dans leurs puits respectifs :<ul style="list-style-type: none"><li>- 1 goutte (<math>\approx 50 \mu\text{l}</math>) de contrôle positif et négatif</li><li>- 1 goutte d'échantillon dilué (1/5 au dépistage)</li></ul></li></ul>	18-24 heures +2°C - +8°C
Lavage en tampon PBS	Rincer délicatement la lame avec une pissette puis immerger la dans un bain de PBS	10 minutes
Incubation du <b>conjugué A</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>Retirer la lame du bain de PBS</li><li>Placer la lame dans la chambre humide</li><li>Déposer IMMEDIATEMENT dans chaque puits, une goutte de <b>conjugué A</b></li></ul>	30 minutes Température ambiante
Lavage en tampon PBS	Rincer délicatement la lame avec une pissette puis immerger la dans un bain de PBS	10 minutes
Incubation du <b>conjugué B</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>Retirer la lame du bain de PBS</li><li>Placer la lame dans la chambre humide</li><li>Déposer IMMEDIATEMENT dans chaque puits, une goutte de <b>conjugué B</b></li></ul>	30 minutes Température ambiante
Lavage en tampon PBS	Rincer délicatement la lame avec une pissette puis immerger la lame dans un bain de PBS. (ajouter éventuellement <b>2 à 3 gouttes de Bleu Evans</b> pour contre colorer)	10 minutes
Montage	<ul style="list-style-type: none"><li>Sortir la lame, éliminer l'excès de PBS avec du papier absorbant</li><li>NE PAS LAISSER SECHER LA LAME</li><li>Déposer IMMEDIATEMENT <b>3 gouttes de milieu de montage</b></li><li>Recouvrir d'une lamelle</li></ul>	
Lecture	<ul style="list-style-type: none"><li>Lecture au microscope à fluorescence au grossissement x200 ou plus.</li></ul>	

**BioMédical Diagnostics SA**

**Siège Social**

Actipole 25  
4 bld de Beaubourg  
77435 Marne la Vallée Cx2  
France

Tel : 33 1 64 62 10 12  
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : [support@bmd-net.com](mailto:support@bmd-net.com)  
Internet : [www.bmd-net.com](http://www.bmd-net.com)





# ISLET CELL ANTIBODY (ICA<sub>b</sub>) TEST SYSTEM


**IMM 1123-40**


## Sections of monkey pancreas

### INTENDED USE

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

### SUMMARY AND EXPLANATION

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

Prognosis, treatment and disease management are different for each type. It is well accepted that IDDM is an autoimmune disease targeting  $\beta$ -cells of the islets of Langerhans in the pancreas. The autoimmune response to islet cell antigens elicits antibody responses to antigens such as glutamic acid decarboxylase (GAD), ICA-512 and insulin.

They have been found to be highly predictive markers, particularly if present in high titer<sup>(1,15)</sup>. Detection of these ICA<sub>b</sub>'s by indirect immunofluorescence (IF) on pancreas substrate is considered the gold standard for diagnosis of IDDM<sup>(16,17)</sup>. These cytoplasmic ICA<sub>b</sub>'s are currently used for the prediction of type I diabetes<sup>(18,20)</sup>.

ICA<sub>b</sub>'s are detected in up to 90% of newly diagnosed diabetic patients. In the Bart's-Windsor family study, 100% of the first degree relatives of IDDM patients with ICA<sub>b</sub>'s >80 JDF units progressed to IDDM within 10 years. The level of ICA<sub>b</sub>'s appears to be highest prior to the onset of Type I diabetes and diminishes progressive thereafter<sup>(12,18)</sup>. ICA<sub>b</sub>'s have several distinct specificities and show two major patterns of reactivity<sup>(4)</sup>. The first pattern is restricted predominantly to the  $\beta$ -cells. The second stains all cells within the islet, and is the classical staining pattern for cytoplasmic ICA<sub>b</sub>'s.

### PRINCIPLE OF THE TEST

Islet cell antibodies are detected by indirect immunofluorescence (IF). In this method, patients' sera are incubated on sections of monkey pancreas to allow binding of antibodies to the tissue substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of these sections with fluorescein-labeled conjugates. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of islet cell antibodies is demonstrated by an apple green fluorescence of the cytoplasm of the islets of Langerhans. The titer (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) is then determined by testing serial dilutions of the positive control<sup>(21)</sup>.

### REAGENTS

Monkey Pancreas Substrate Slides <b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>4</b>	<b>10 x 4 wells</b>
Islet Cell Antibody Positive Control. Human serum containing islet cell antibodies, standardized against the JDF (Juvenile Diabetes Foundation) positive reference serum. <b>JDF units are stated on the vial label.</b> Ready to use <b>CONTROL</b> <b>+</b>	<b>1 x 0,5 mL</b>
Negative Control (contains <0.1% NaN <sub>3</sub> ) Ready to use <b>CONTROL</b> <b>-</b>	<b>1 x 0,5 mL</b>
Goat anti-human IgG FITC conjugate, heavy chain specific (contains <0.1% NaN <sub>3</sub> ). <b>Protect from light.</b> Ready to use <b>CONJ</b> <b>FITC</b> <b>IgG</b>	<b>1 x 5 mL</b>
Conjugate B (contains <0.1% NaN <sub>3</sub> ) – <b>Protect from light.</b> Ready to use <b>CONJ</b> <b>FITC</b> <b>B</b>	<b>1 x 5 mL</b>
Sample Diluent (contains <0.1% NaN <sub>3</sub> ) Ready to use <b>DIL</b> <b>SPE</b>	<b>1 x 60 mL</b>
Phosphate Buffered Saline (PBS) - Dissolve each vial to 1 liter. To dilute <b>BUF</b> <b>WASH</b> <b>RCNS</b> <b>1L H<sub>2</sub>O</b>	<b>2 vials</b>
Mounting Medium (contains <0.1% NaN <sub>3</sub> ). <b>Do not freeze.</b> Ready to use <b>MM</b>	<b>1 x 5 mL</b>
Evans Blue Counterstain Ready to use <b>EVAN'S BLUE</b>	<b>1 x 1 mL</b>
Coverslips	<b>12</b>

## MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

---

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

## STORAGE AND PREPARATION

---

Store all reagents at +2°C/+8°C.

Reagents are ready for use after equilibration to room temperature.

## PRECAUTIONS

---

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing, and disposing of these materials<sup>(22)</sup>.

**WARNING** - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide build up. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center. Instructions should be followed exactly as they appear in this insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from sources other than the same catalogue number from BMD. Do not use beyond expiration date.

## SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

---

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

## PROCEDURE

---

### A. Screening:

**Step 1** Dilute each patient serum **1:5** with the Buffered Diluent provided (0.1ml serum + 0.4ml diluent). Screening at more than one dilution helps to avoid a "prozone phenomenon." For screening, **DO NOT dilute the Positive or Negative Controls**. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.

**Step 2** Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for **10-15 minutes**. Carefully remove the slides from their pouch without touching the substrate.

**Step 3** Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.

**Step 4** Using a micropipette or Pasteur pipette, apply **1 drop** (approximately 50ul) of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of Positive Control to well #2. Avoid overfilling the wells.

**Step 5** Using a micropipette or Pasteur pipette, apply **1 drop** of patient's diluted serum (approximately 50µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.

**Step 6** Place the lid on the incubation chamber and incubate slides **18-24 hours at +2°C/+8°C**.

**Step 7** Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately **10ml** of PBS using a pipette, or rinse slide in a beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides.

**Step 8** Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the **goat anti-human IgG FITC conjugate** dropper vial and gently squeeze to apply **1 drop** (approximately 50ul) to each well. Repeat process with all remaining slides.

**Step 9** Replace the lid on the incubation chamber. Incubate **30 minutes** at room temperature.

**Step 10** Repeat **Steps 7 through 9** except in **Step 8** use **Conjugate B**.

**Step 11** Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides. If desired, **2-3 drops** of Evans blue counterstain may be added to the final wash.

**NOTE:** *Improper washing may lead to increased background fluorescence.*

**Step 12** Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **While slide is still wet mount the coverslip**. Place **3 drops** of the Mounting Medium evenly spaced on a coverslip and invert the slide onto the coverslip. To remove any air bubbles gently apply pressure along the edge of the coverslip. Avoid any movement of the coverslip. Repeat process with all remaining slides.

**Step 13** Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater. Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of an antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed. Slides should be stored in the dark at +2°C/+8°C.

### B: End Point Determination (Titration)

Serum found positive in the screening test may be further tested to determine the titer by following **Steps 5 through 13**. Each test run should include the undiluted Negative Control and **undiluted, 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16** dilutions of the Positive Control. Serial two-fold dilutions of the patients serum should be made as well starting at 1:5. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer. If the Positive Control titer is within the limits defined by the enclosed QC specifications, the levels of the antibody in patient serum can then be reported in JDF units (16). The JDF unit value of the Positive Control is printed on the vial label. To calculate the JDF unit value of the unknown serum, simply divide the titer of the unknown by the titer of the Positive Control and multiply this by the JDF units on the Positive Control label.

#### Example:

Positive Control titer is 1:4.

Unknown Sample titer 1:10.




Positive Control label reads 160 JDF units.

#### Calcul :

Concentration of ICAB	=	$\frac{10}{4}$	x	160	=	400 JDF units
-----------------------	---	----------------	---	-----	---	---------------

### C. Preparation of Serial Dilutions

For each serum positive for islet cell antibodies upon screening, number four tubes 1 to 4 and add 0.4ml of Buffered Diluent to tube 1 and 0.2ml to subsequent tubes. Pipette 0.1ml of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 0.2ml from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 0.2ml from one tube to the next after mixing to yield the expected dilutions as depicted in the following table:

Tubes	1	2	3	4
Sérum	0.1 mL +			
Buffered diluent	0,4 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
Transfer				
		0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
Final dilution	1/5	1/10	1/20	1/40

### QUALITY CONTROL

Both a positive and negative control serum should be included with each test run.

The negative control should show no significant fluorescence of the islet cells.

The positive control should stain the cytoplasm of the islet cells.

Upon titration of the positive control, an endpoint titer of  $\pm$  doubling dilution from the indicated titer should be obtained.

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

- Turbidity. Discard and use another control.
- Problems with the optical System of the fluorescence microscope. These may include: improper alignment, use of the bulb beyond the expected performance life, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.
- Improper preparation of serial dilutions of control.

### RESULTS

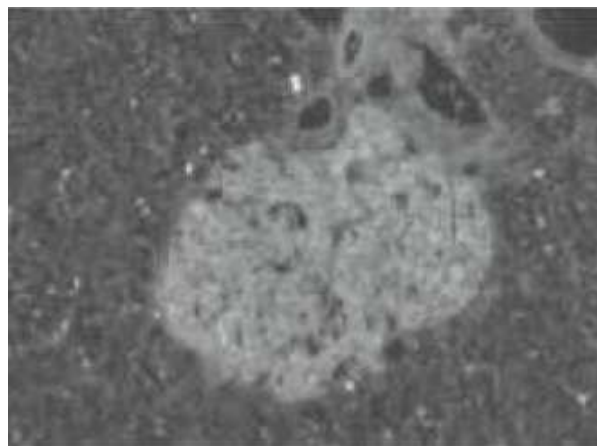
The results of the tests for islet cell antibodies should be reported as negative (<5) or positive with titer or JDF units (8).

Read for specific staining of the cytoplasm of the islet of Langerhans. Various other tissue antibodies such as antinuclear antibodies (ANA), mitochondrial antibodies, and smooth muscle antibodies may also be observed on pancreas sections. Sera giving **any of these reactions** should be reported as negative for antibodies to islet cells.

Any sera giving **nuclear staining reactions** may be tested with the Antinuclear Antibody (ANA) Test (HEp-2 Cells) or the Antinuclear Antibody (ANA) Test (Mouse Liver Sections).

Any sera giving **smooth muscle or mitochondrial staining reactions** may be tested with the Autoantibody Test System (Mouse Kidney/ Stomach Sections).

**NOTE:** *Anti-Islet Cell Antibody reactions are, by their nature, much weaker than reactions for ANA or most other immunofluorescence autoantibody reactions.*



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

### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Occasionally sera may exhibit strong staining for ANA or other autoantibodies. These may interfere with the ability to detect islet cell antibodies. In such cases, titrating the serum may permit the visualization of the islet cell antibodies. In other cases their titer may be lower than the ANA or other antibodies and hence may not be detected. The islet cell antibody test should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only.

## EXPECTED VALUES

Approximately 50-80% of new-onset diabetics are positive for islet cell antibodies. The prevalence of islet cell antibodies in non-diabetic first-degree relatives and in non-diabetic normal subjects has been reported to be 2-5% and 0.25-1.7%, respectively (5,16). Approximately 11% of islet cell antibody positive first-degree relatives develop diabetes each year. Intervals of as long as 8 years between detection of islet cell antibodies and the onset of diabetes have been reported.

### Incidence of Anti-Islet Cell Antibodies













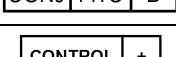
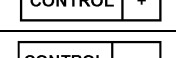
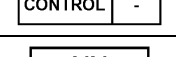
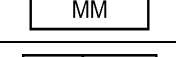
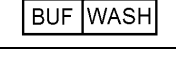
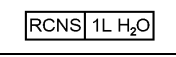
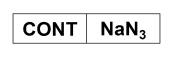
Disease Group	Age (years)	No. Patients examined	% Positive
<b>Type I Diabetes (IDDM)</b>			
<b>At onset</b>	<1-10	19	63
	11-20	25	60
	21-40	8	25
<b>Long standing</b>	<1-10	22	41
	11-20	71	39
	21-40	26	24
	41-70	13	0
	71-80	3	33
<b>Type II Diabetes (IDDM)</b>			
<b>At onset</b>	<1-40	0	-
	41-80	39	3
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

## REFERENCES

- Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J et al. N. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin dependent diabetes. *New Engl J Med*; 1990, 323:1167-1172.
- Neufeld M, Maclaren NK, Riley WJ et al. Islet cell and other organ-specific antibodies in U.S. Caucasians and Blacks with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*; 1980, 29:589-592.
- Gianani R, Pugliese A, Bonner-Weir S et al. Prognostically significant heterogeneity of cytoplasmic islet cell antibodies in relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes*; 1992, 41:347-353.
- Ziegler AG, Herskowitz RD, Jackson RA et al. Predicting Type I Diabetes. *Diabetes Care*; 1990, 13:762-775.
- Gale EAM and Bottazzo GF. Can we predict type I (insulin dependent) diabetes? In "World Book of Diabetes in Practice"; 1986, Vol 2, Krall L, Ed, Elsevier, New York, 25-29.
- Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J et al. Evidence for a long pre-diabetic period in Type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Lancet*; 1981, 2:1363-1365.
- Tarn AC, Bonifacio E, Dean BM et al. Predicting insulin-dependent diabetes (Letter). *Lancet*; 1988, 2:627-628.
- Jackson RA, Soeldner JS and Eisenbarth GS. Predicting insulin-dependent diabetes (Letter). *Lancet*; 1988, 2:627-628.
- Srikanta S, Ganda OP, Gleason RE et al. Pre-type I diabetes: linear loss of beta cell response to intravenous glucose. *Diabetes*; 1984, 33:717-720.
- Srikanta S, Ganda OP, Rabizadeh A et al. First degree relatives of patients with type I diabetes mellitus: islet cell antibodies and abnormal insulin secretion. *N Engl J Med*; 1985, 313:461-464.
- Srikanta S, Ganda OP, Jackson RA et al. Pre-type I diabetes: common endocrinologic course despite immunologic and immunogenetic heterogeneity. *Diabetologia*; 1984, 27:146-149.
- Riley WJ, Spillar RP, Waltz J and Brody B. Predictive value of islet cell antibodies (ICA) - 6 years experience (Abstract). *Diabetes*, 1983, 33 (Suppl 1):44A.

- Riley W, Maclaren N, Spillar RP et al. Predictive value of ICA for IDD and insulinopenia to iv glucose (Abstract): *Diabetes* 37 1988, (Issue 5 Suppl): 5A.
- Maclaren NK, Home G, Spillar RP et al. Islet cell antibodies (ICA) in U.S. school children (Abstract). *Diabetes*; 1985, 34 (Suppl 1):84A.
- Spencer KM, Tarn A, Dean BM et al. Fluctuating islet cell autoimmunity in unaffected relatives of patients with insulin dependent diabetes. *Lancet*; 1984, 1:764-766.
- Greenbaum J, Palmer JP, Nagataki S et al. Improved specificity of ICA assays in the fourth international immunology of diabetes serum exchange workshop. *Diabetes*; 1992, 41:1570-1574.
- Bonifacio E, Lemmark A, Dawkins RL et al. Serum exchange and use of dilutions have improved precision of measurement of islet cell antibodies. *J Immunol Methods*; 1988, 106:83-88.
- Kolb H, Dannehl K, Grueneklee D et al. Prospective analysis of islet cell antibodies in children with type I (insulin dependent) diabetes; 1988, *Diabetologia*; 1988, 31:189-194.
- Srikanta S, Ganda OP, Jackson RA et al. Type I diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive cell destruction. *Ann Intern Med*; 1983, 99:320-326.
- Betterle C, Presotto F, Fedini B et al. Islet cell and insulin autoantibodies in organ specific autoimmune patients: their behaviour and predictive value for the development of type I diabetes mellitus: a 10 year follow-up study. *Diabetologia*; 1987, 30:292-297.
- Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelki TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelki TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York; 1987, 3rd Ed, 3-40.
- Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. [HHS Pub. No. (CDC) 1993, 93-8395].

## SYMBOLS USED

	Biological risks
	Consult instructions for use
	Number of tests
	Catalogue Number
	Batch Code
	Use by
	Temperature limitation
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device
	EC Declaration of Conformity
	Immunofluorescent assay
	Slide of 4 wells
	Fluorescent antibody conjugates
	
	Positive control
	Negative control
	Mounting Medium
	Wash Buffer
	Reconstitute with 1L distilled water
	Contains sodium azide

## SUMMARY OF METHOD

### Detection of islet cell antibodies

	Handling Procedure	Incubation Time
Sera Incubation	<ul style="list-style-type: none"><li>Remove the slide from his pouch and place it in an incubation chamber.</li><li>Apply quickly in the respective wells :<ul style="list-style-type: none"><li>- 1 drop (<math>\approx 50 \mu\text{l}</math>) of positive and negative control</li><li>- 1 drop of patient's diluted serum (1/5 in screening)</li></ul></li></ul>	18-24 hours 2 - 8°C
Wash with PBS	Rinse gently with a washing bottle of PBS then, transfer into Coplin jar with PBS.	10 minutes
Incubation of <b>conjugate A</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>Remove the slide from Coplin jar</li><li>Place the slide in the incubation chamber</li><li>IMMEDIATELY apply in each well one drop of <b>conjugate A</b></li></ul>	30 minutes at room temperature
Wash with PBS	Rinse gently with a washing bottle of PBS then, transfer into Coplin jar with PBS.	10 minutes
Incubation of <b>conjugate B</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>Remove the slide from Coplin jar</li><li>Place the slide in the incubation chamber</li><li>IMMEDIATELY apply in each well one drop of <b>conjugate B</b></li></ul>	30 minutes at room temperature
Wash with PBS	Rinse gently with a washing bottle of PBS then, transfer into Coplin jar with PBS (if desired, add <b>2-3 drops of Evans Blue</b> counterstain)	10 minutes
Montage	<ul style="list-style-type: none"><li>Remove the slide, blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS.</li><li>DO NOT ALLOW THE SLIDE DRYING</li><li>IMMEDIATELY apply <b>3 drops of the mounting medium</b></li><li>Place the coverslip</li></ul>	
Reading	<ul style="list-style-type: none"><li>Reading under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.</li></ul>	

**BioMédical Diagnostics SA**

**Office**

Actipole 25  
4 bld de Beaubourg  
77435 Marne la Vallée Cx2  
France

Tel : 33 1 64 62 10 12  
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : [support@bmd-net.com](mailto:support@bmd-net.com)  
Internet : [www.bmd-net.com](http://www.bmd-net.com)

