

# НАБОР ИФА ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АУТОАНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК

## 7010, Isletest-ICA

Каталог. № : 7010

Методика от 11-2012

Количество : 96

Производитель: **BIOMERICA INC.,**  
(США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Инсулинозависимый диабет (ИЗСД) или диабет первого типа представляет собой тяжёлое хроническое заболевание, характеризующееся нарушением синтеза и секреции инсулина, который является основным регулятором метаболизма глюкозы в периферической крови. Инсулин синтезируется и секретруется специализированными клетками поджелудочной железы, так называемыми бета-клетками островков Лангерганса<sup>(1)</sup>. Выработка специфических аутоантител к бета-клеткам островков Лангерганса ведет к разрушению последних по механизму антителозависимой цитотоксичности, что приводит, в свою очередь, к нарушению синтеза инсулина и клиническим признакам ИЗСД<sup>(2-4)</sup>. Аутоиммунные механизмы разрушения клеток могут иметь наследственную природу и/или запускаться некоторыми внешними факторами, такими как вирусные инфекции, воздействие токсических веществ и различные формы стресса<sup>(5)</sup>.

ИЗСД характеризуется наличием асимптоматической стадии предиабета, которая может длиться в течение нескольких лет. Нарушение синтеза и секреции инсулина в этот период может быть выявлено только с помощью теста определения толерантности к глюкозе. В большинстве случаев у этих лиц с асимптоматическим течением ИЗСД выявляются аутоантитела к клеткам островков Лангерганса (ICA) и/или антитела к инсулину (IAA). Описаны случаи выявления ICA за 8 и более лет до появления клинических признаков ИЗСД<sup>(6)</sup>, таким образом, определение уровня ICA может служить для ранней диагностики и выявления предрасположенности к ИЗСД. У пациентов с наличием ICA наблюдается прогрессивное снижение функции бета-клеток, что проявляется в нарушении ранней фазы секреции инсулина. При полном нарушении этой фазы секреции появляются клинические признаки ИЗСД<sup>(6)</sup>.

Исследования показали, что ICA определяются у 70% больных с впервые выявленным ИЗСД<sup>(13, 14)</sup> по сравнению с контрольной недиабетической популяцией<sup>(11, 15)</sup>, где ICA выявляются в 0,1-0,5% случаев. ICA также выявляются у близких родственников больных диабетом. Эти лица составляют группу повышенного риска развития ИЗСД. В ряде исследований показано, что у ICA - позитивных близких родственников больных диабетом впоследствии развивается ИЗСД<sup>(16-19)</sup>. В других работах также доказано значение присутствия сывороточных ICA и IAA для повышения вероятности развития ИЗСД<sup>(3, 6-12)</sup>. Таким образом, определение ICA полезно для ранней диагностики ИЗСД. Высокая прогностическая значимость определения ICA определяется тем, что у пациентов с наличием ICA даже при отсутствии признаков диабета, в конечном счете, тоже развивается ИЗСД. Riley и соавт. показали, что определение уровня ICA у больных с инсулинонезависимым сахарным диабетом (диабет второго типа), может помочь в выявлении диабета еще до появления соответствующих клинических симптомов и определить необходимость терапии инсулином<sup>(20)</sup>. Следовательно, у больных диабетом второго типа при наличии ICA можно с большой вероятностью предположить развитие инсулиновой зависимости.

Определение уровня ICA в периферической крови важно для выявления в популяции предрасположенных лиц и родственников больных диабетом, имеющих генетическую предрасположенность к ИЗСД. Недавнее международное исследование подтвердило огромную важность этого теста для определения аутоиммунного процесса, направленного против островковых клеток<sup>(21)</sup>.

До недавнего времени определение ICA основывалось на методах гистохимии и непрямой иммунофлюоресценции с использованием в качестве субстрата замороженных нефиксированных срезов поджелудочной железы, полученных от приматов или грызунов.

Методы были впервые предложены в 1974 году<sup>(22, 23)</sup>. Несмотря на многочисленные попытки усовершенствования и модификации процедур исследования, ряд методических проблем остался нерешенным. Большое затруднение вызывает стандартизация исследований. Достоверность результатов данных исследований ограничивается такими факторами, как различия биологического материала (срезы поджелудочной железы), неизбежная необходимость использовать нефиксированные «замороженные срезы» и дефицит в получении соответствующих тканей. Исследователями фирмы Biomerica были идентифицированы и очищены специфические антигены бета-клеток островков Лангерганса, на основе которых был разработан иммуноферментный метод определения ICA.

### II. ПРИНЦИП МЕТОДА

Высокоочищенная смесь антигенов панкреатических клеток адсорбирована на стенках лунок стандартного микропланшета. При нанесении контролей и разведенных исследуемых сывороток в лунки, присутствующие в них ICA связываются с иммобилизованными антигенами. Несвязавшиеся антитела удаляются в результате промывки. После этого в лунки вносятся козы антитела к IgG человека, меченые ферментом (конъюгат), которые связываются с комплексом "антиген-антитело", иммобилизованным на поверхности лунок. Несвязавшийся конъюгат удаляется в результате второй промывки. Добавление субстрата приводит к развитию окраски, интенсивность которой измеряется спектрофотометрически. Оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации ICA в образце. Результаты рассчитываются на основании сравнения оптической плотности (ОП) образца со значением ОП Cut-off. Положительный контроль служит внутренним контролем качества, гарантирующим правильность получаемых результатов.

### III. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Все реагенты, предоставляемые с набором, предназначены только для in-vitro диагностики.

#### Материалы, представляющие потенциальную инфекционную опасность

Калибраторы и Контроли, входящие в состав набора, приготовлены на основе человеческой сыворотки. Образцы сыворотки, использованные при их приготовлении, имели отрицательные результаты при исследовании FDA-лицензированными реагентами на наличие антител к ВИЧ и поверхностного антигена гепатита В. Тем не менее, так как не существует методов, полностью гарантирующих отсутствие ВИЧ, HBs-антигена или каких-либо других инфекционных агентов в биологическом материале, рекомендуется обращаться с этими реагентами как с потенциально инфекционно-опасными.

#### Азид натрия

Некоторые реагенты, входящие в состав набора, содержат азид натрия в качестве консерванта, который может взаимодействовать с некоторыми металлами (медь, латунь, свинец) с образованием взрывчатых веществ. При попадании этих реагентов на кожу смывайте их большим количеством воды.

#### Стоп раствор

Стоп раствор состоит из 1N NaOH, с которым необходимо обращаться с осторожностью. Может вызывать ожоги; использовать перчатки, защиту для глаз и защитную одежду. Избегать ингаляции. Разлитый раствор разбавить с водой перед тем, как вытереть его при помощи бумажного полотенца.

#### Замечания по процедуре

1. Не замораживайте реагенты. Храните все компоненты набора при температуре 2-8°C.
2. При каждой постановке используйте отрицательный и положительный контроли.
3. Наборы предназначены только для исследования сывороток крови. Гемолиз, сильная мутность и бактериальные включения влияют на результаты исследования.
4. Исследуйте сыворотки в дубликатах.
5. Не смешивайте реагенты из разных партий наборов.
6. Не пользуйтесь просроченными реагентами.
7. Не оставляйте реагенты на продолжительное время при комнатной температуре.
8. Не подвергайте раствор субстрата воздействию прямых солнечных лучей.
9. Точное дозирование необходимо для получения воспроизводимых результатов.

#### IV. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

##### Материалы, входящие в состав набора

1.	PLA ICA = ICA-микроруночные полоски (с держателем)	12 штук
2.	CONJ ENZ 6X = ICA-IgG Ферментный конъюгат (конц.)	2 x 1.0 мл
3.	DIL SPE 5X = растворитель образцов Isletest (конц.)	1x25.0 мл
4.	CONJ ENZ DIL = Растворитель конъюгата Isletest (конц.)	1x10.0 мл
5.	CTRL REF ICA = ICA – Референсный Контроль	1 x 1.5 мл
6.	CTRL + ICA = ICA – Положительный контроль (сыворотка человека)	1 x 1.5 мл
7.	CTRL – ICA = ICA – Отрицательный контроль (сыворотка человека)	1 x 1.5 мл
8.	SUBS PNPP = Раствор субстрата Isletest (PNPP)	1x15.0 мл
9.	BUF WASH 25X = Промывочный буфер Isletest (конц.)	1x20.0мл
10.	SOLN STP = Стоп раствор Isletest (1N NaOH)	1 x 6.0 мл

##### V. Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

1. Дистиллированная или деионизированная вода.
2. Впитывающие бумажные салфетки для сушки полосок после мытья и парафильм/пластиковые обертки для покрытия полосок во время инкубации.
3. Стеклообразные пробирки для разведения сывороток.
4. Микропипетки со сменными наконечниками на 10, 50 и 100 мкл.
5. Вошер - устройство для промывки планшетов (автоматическое или ручное).
6. Пипетка на 5 мл для конъюгата.
7. Градуированная лабораторная посуда, объемом 500 мл.
8. Планшетный фотометр с длиной волны 405 нм.
9. Этикетки для пометки неиспользованных лунок перед анализом.

##### VI. СБОР ОБРАЗЦОВ

Соберите 5-10 мл венозной крови в пробирку для сгустков (красный верх). Необходимо использовать отделители сыворотки. Отделите сыворотку центрифугированием после формирования сгустка. Образцы сыворотки могут храниться при температуре 2-8°C до 24 часов. Если в течение этого времени нет возможности провести исследование сыворотки, то ее необходимо заморозить (-20°C). Выявленный гемолиз, липемия, мутность и бактериальные включения могут влиять на точность результатов исследования.

##### VII. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

###### 1. Восстановление Ферментного Конъюгата ICA-IgG:

Аккуратно перенесите 5 мл раствора для разведения конъюгата в один из двух флаконов с концентрированным раствором конъюгата, закройте флакон и осторожно перемешайте переворачиванием. Храните разведенный конъюгат при температуре 2-8°C, если он не используется. Пометить дату на этикетке. **Рабочий раствор конъюгата годен к употреблению в течение 30 дней с момента приготовления.** В состав набора входит 2 флакона с концентрированным раствором конъюгата, содержимого каждого флакона достаточно для проведения 48 определений на 6 стрипах.

###### 2. Буфер для разведения проб Isletest:

Поместить содержимое флакона (25 мл) в 100 мл дистиллированной или деионизированной воды и тщательно перемешайте. Промаркируйте колбу соответствующим образом и храните разведенный буферный раствор при температуре 2-8°C. Полученный раствор годен к употреблению на протяжении всего времени использования набора.

###### 3. Промывочный буфер Isletest:

Вылейте содержимое флакона в 500 мл емкость (следите за переносом всех кристаллов), добавьте 480 мл дистиллированной или деионизированной воды и тщательно перемешайте. Промаркируйте емкость с буфером соответствующим образом и храните разведенный буфер при 2-8°C. Разведенный буфер годен к употреблению на протяжении всего времени использования набора.

###### 4. Подготовка образца сыворотки:

В промаркированные соответствующим образом пробирки внесите по 1,0 мл рабочего раствора буфера для разведения проб, после чего добавьте в каждую пробирку по 10 мкл соответствующей сыворотки. Хорошо перемешайте.

##### VIII. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Тестовый набор содержит 12 микролуночных полосок, покрытых очищенными клетками антигенов. Количество полосок, используемых в каждом анализе, зависит от количества тестируемых образцов сыворотки. Если используются 12 полосок,

то 45 образцов сыворотки могут тестироваться этим набором в дублях.

**Замечание:** Изменение температуры инкубации более, чем на +/- 1°C может оказывать значительное влияние на достоверность получаемых результатов. Перед проведением исследования прогрейте реагенты и сыворотки до комнатной температуры (25 °C).

1. Подсчитайте количество стрипов, необходимое для настоящего исследования. Вставьте нужное количество стрипов в рамку. Остальные стрипы верните в оригинальную упаковку.
2. Сделайте необходимые пометки по размещению образцов в планшете, например, #A1, B1, C1, D1 и т.д.
3. Добавьте 100 мкл отрицательного контроля в лунки C1 и D1.
4. Добавьте 100 мкл положительного контроля в лунки E1 и F1.
5. Добавьте 100 мкл Референсного контроля в лунки G1 и H1.
6. Добавьте 100 мкл разведенных сывороток (смотри пункт 4. в разделе «Приготовление реагентов и образцов») в лунки стрипов, начиная с лунок A2 и B2. в дублях. Для большого количества образцов пациентов используйте дополнительные полоски и добавьте другие разбавленные образцы пациентов в микролуночки в дублях. Должно быть 100 мкл раствора в каждой лунке, кроме лунок A1 и B1, которые не заполнены на данном этапе и будут использоваться позже.
7. Остальные стрипы храните с осушителем в плотно закрытой оригинальной упаковке при 2-8°C.
8. Закройте планшет парафильмом или специальной пленкой для планшетов (для предотвращения контаминации) и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (25 +/-1°C).
9. После окончания инкубации вытряхните жидкость из лунок, промокните планшет фильтровальной бумагой и промойте планшет 3 раза по 300 мкл промывочным буфером, используя автоматическое или ручное промывочное устройство (вошер), флакон-диспенсор или автоматическую многоканальную пипетку. Избегайте воздушных пузырьков во время промывки. Высушите планшет на фильтровальной бумаге после третьей промывки.
10. Добавьте по 100 мкл Рабочего Раствора конъюгата (смотри пункт 1. в разделе «Приготовление реагентов и образцов») во все лунки за исключением лунок A1 и B1.
11. Закройте планшет парафильмом или пленкой для планшетов и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (25 +/-1°C).
12. После окончания инкубации промойте планшет, как описано в шаге 8 данного раздела и высушите планшет на фильтровальной бумаге.
13. Внесите по 100 мкл субстратного раствора во все лунки, включая лунки A1 и B1. Вносите субстратный раствор быстро и без перерывов.
14. Закройте планшет парафильмом или пленкой для планшетов и инкубируйте 30 минут в темном месте при комнатной температуре (25 +/-1°C).
15. Через 30 минут добавьте по 50 мкл раствора для остановки реакции во все лунки планшета, вносите раствор максимально быстро.
16. Профотометрируйте планшет на планшетном фотометре при длине волны 405 нм против бланка (лунки A1 и B1).
17. Рассчитайте результаты, как показано в следующем разделе.

##### IX. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты рассчитываются исходя из оптической плотности как показано в примере. Значение Оп в данном тесте может быть другим, это только пример.

1. Рассчитайте среднее значение оптической плотности в дублях для всех образцов и контролей.

Среднее Оп: Референсное (R), Отрицательное (N), Положительное (P), Образцы (S).

2. Разделить Среднее значение оптической плотности Образцов и Контролей на значение R. Это дает значение соотношения для каждого образца.

##### Интерпретация:

Значение соотношения ICA (Ед/мл)	Результат
< 0.95	Отрицательный
> 1.05	Положительный
0.95 – 1.05	Неопределенный (граничная линия)

Образцы со значениями пропорции < 0.95 указывают на низкий уровень антител ICA, значения > 1.05 указывают на высокий уровень антител ICA. Образцы со значениями между 0.95 и 1.05 считать

неопределенными. Рекомендуется повторное тестирование неопределенных образцов или тестирование нового образца позже.

#### Секция А: Контрольные результаты

Данные			Коэффициент соотношения	Результат
Контроли	ОП	Среднее Оп		
Референсный	1.072	R = 1.082	1.00	
	1.092			
Отрицательный	0.290	N = 0.297	0.27	Отрицат.
	0.303			
Положительный	1.413	P = 1.409	1.30	Положит.
	1.406			

Примечание: Чтоб тест считался действительным, коэффициент соотношения,  $N > 0.95$  и  $P > 1.05$ . Повторить тест, если результаты не действительны.

#### Секция В: Результаты Образцов пациентов

Данные			Коэффициент соотношения	Результат
Образец	ОП	Среднее Оп		
Референсный Контроль	1.072	R = 1.082	1.00	
	1.092			
1	1.444	$S_1 = 1.458$	1.35	Положит.
	1.472			
2	0.549	$S_2 = 0.541$	0.50	Отрицат.
	0.534			
3	1.036	$S_3 = 1.043$	0.96	Неопредел.
	1.051			

#### Х. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Чтобы результаты считались действительными, необходимо проводить тестирование Положительного и Отрицательного Контролей вместе с образцами каждый раз, когда проводится тестирование.

Отрицательный контроль должен показывать значения  $< 0.95$  Ед/мл и Положительный контроль  $> 1.05$  Ед/мл.

#### ХІ. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность антигенного материала была подтверждена при использовании контрольных положительных образцов сывороток, наличие ICA в которых было установлено с помощью референсного метода (Western blot). Образцы, содержащие аутоиреидные антитела и ревматоидный фактор, показали отрицательные результаты в этом тесте.

#### ХІІ. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Данный тест позволяет определять наличие антител ICA в образцах сыворотки. Диагноз ИЗСД не может базироваться исключительно на результатах теста.

Сохраните слабо положительные и граничные образцы (в пределах 5 % значения референсного Контроля ОП) и храните их при  $-20$  °С. Свежие образцы от данных пациентов должны быть протестированы снова каждые 6 месяцев вместе с предыдущими образцами.

**ДАННЫЙ ТЕСТ ЯВЛЯЕТСЯ ТОЛЬКО СКРИНИНГОВЫМ ТЕСТОМ. ДИАГНОЗ ДОЛЖЕН БЫТЬ ПОСТАВЛЕН С УЧЕТОМ ДАННЫХ МЕДИЦИНСКОЙ ИСТОРИИ ПАЦИЕНТА, КЛИНИЧЕСКИХ СИМПТОМОВ И РЕЗУЛЬТАТОВ ДРУГИХ ТЕСТОВ.**



#### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)