



# CentAK® anti-IAA MODE D'EMPLOI

100 Tests

REF 1735 (rév. 28/07/2010)

CE

Test direct de radioliation pour le dosage des auto-anticorps anti-insuline dans le sérum humain.

















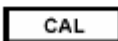

**MEDIPAN GMBH**

Ludwig-Erhard-Ring 3  
**15827 Dahlewitz / Berlin (Germany)**

...

Phone: +49(0)33 708 / 44 17 - 0  
Fax: +49(0)33 708 / 44 17 - 25

info@medipan.de  
www.medipan.com

IFU symbols radioactive assays MEDIPAN GMBH			
 IVD	Dispositif de diagnostic in vitro	 CE	Déclaration de conformité CE
 REF	Référence catalogue	 LOT	Numéro de lot
	Date de péremption		Fabriqué par
	Se référer aux documents		Consulter le mode d'emploi
	A stocker à		Risque biologique
	Composant radioactif		
 TRAC	Traceur	 BUF D	Tampon
 CONTROL	Contrôle sérum	 CAL	Standards
 PRE	Suspension de protéine A		

## INTRODUCTION

Le diabète de type 1, aussi connu sous le nom de diabète insulino-dépendant (DID), résulte d'une destruction auto-immune chronique des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas, probablement initiée par un facteur de l'environnement chez un hôte génétiquement prédisposé. La destruction des cellules bêta est complètement asymptotique jusqu'à atteindre un seuil critique (20%) du nombre de cellules fonctionnelles et ce processus peut prendre plusieurs années, l'hyperglycémie pouvant apparaître à n'importe quel âge de la vie.

La présence d'auto-anticorps anti-insuline (IAA) avant toute insulinothérapie, à ne pas confondre avec les anticorps anti-insuline (IAb) indique clairement un processus de destruction des cellules bêta langerhansiennes. La mise en évidence des IAA est particulièrement importante pour évaluer le risque de diabète de type 1 chez les enfants d'autant plus qu'ils constituent souvent les premiers marqueurs de risque avant l'apparition de tout symptôme clinique.

La prévalence de ces auto-anticorps est inversement proportionnelle à l'âge des patients au moment du diagnostic.

Les IAA sont présents chez plus de 90% des enfants de moins de 5 ans au moment du diagnostic. A partir de 20 ans, la prévalence tombe en dessous de 20%.

Lors du 4<sup>ème</sup> Séminaire International sur la Standardisation des dosages des auto-anticorps anti-insuline (1992), les experts ont recommandé l'utilisation des méthodes de radioliation, de préférence à l'ELISA, considérant que les méthodes radioimmunologiques ont une meilleure valeur prédictive de l'apparition du diabète de type 1.

Le dosage des IAA, couplé à celui des anti-GAD65 et des anti-IAA, constitue la base de l'évaluation biologique d'un risque de diabète de type 1.

- Hirata Y, H Ishizu, N Ouchi, S Motomura, M Abe, Y Hara, H Wakasugi, I Takahashi, H Sakano, M Tanaka, H Kawao & T Kanesaki: Insulin autoimmunity in a case with spontaneous hypoglycemia; Japan J Diabet 1970, 13: 312-319

- Palmer JP, CM Asplin, P Clemens, K Lyen, O Tatpati, PK Raghu & TL Paquette: Insulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment; Science 1983, 222:1337-1339

- Palmer JP, CM Asplin, PK Raghu, P Clemens, K Lyen, O Tatpati, B McKnight, TL Paquette, M Sperling, L Baker & R Guthrie: Antiinsulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment - a new marker for autoimmune beta cell damage?; Pediatr Adolesc Endocrinol 1986, 15:111-116

- Greenbaum CJ, CP Palmer, B Kuglin & H Kolb: Insulin autoantibodies measured by radioimmunoassay methodology are more related to insulin-dependent diabetes mellitus than those measured by enzyme-linked immunosorbent assay: results of the Fourth International Workshop on the Standardisation of Insulin Autoantibody Measurement; J clin Endocrinol Metab 1992; 74:1040-1044

- Williams AJK, PJ Bingley, E Bonifacio, JP Palmer & Eam Gale: A novel Micro-assay for Insulin Autoantibodies; J Autoimmunity 1997; 10:473-478

- Lindberg B, SA Ivarsson, M Landin-Olsson, G Sundkvist, L Svanberg & A Lernmark: Islet autoantibodies in cord blood from Children who developed Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus before 15 years of age; Diabetologia 1999; 42:181-187

- Potter KN & T J Wilkins: The molecular specificity of insulin autoantibodies; Diabetes Metab Res Rev 2000; 16:338-353

## PRINCIPE DU DOSAGE

CentAK anti-IAA est un dosage direct basé sur le principe des tests de radioliation. Il permet le dosage des anti-IAA de classe IgG. De l'insuline humaine hautement purifiée mono-iodée (en position 14) est utilisée comme traceur et se lie aux IAA de l'échantillon lors de la première incubation.

En ajoutant un anti-sérum anti-IgG humaine lors d'une seconde incubation, on précipite les complexes IAA-Insuline marquée que l'on sépare par centrifugation de l'excès de traceur. Après avoir décanté ou aspiré le surnageant, la radioactivité du précipité obtenu est mesurée.

Le signal radioactif (cpm) de la fraction liée (B) est directement proportionnel à la concentration en anticorps anti-IAA dans l'échantillon.

Aucun complexe immunitaire n'est obtenu si les anticorps anti-IAA ne sont pas présents dans l'échantillon, puisque le traceur ne se fixe qu'aux anticorps anti-IAA.

Une courbe d'étalonnage est établie en mesurant les cpm (%B/T) des calibrateurs 0 à 4. Les concentrations en anticorps anti-IAA des patients sont directement lues à partir de la courbe standard.

## ECHANTILLONS DES PATIENTS

### Prélèvement et conservation des échantillons

Le sang est prélevé par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum est récupéré par centrifugation. Ne pas utiliser des échantillons de plasma, hémolysés ou lipidiques.

Les échantillons peuvent être conservés à 2 – 8 °C jusqu'à 3 jours. Pour un stockage prolongé, il est préférable de les stocker à –20 °C.

Eviter les congélations/décongélations répétées. Dans le cas d'utilisations multiples, aliquoter les échantillons et les stocker à –20 °C.

## Composition du kit pour 50 dosages

D Traceur (125I-Insuline humaine recombinante)



2 flacons lyophilisés, rouge  
Reconstituer chaque flacon  
dans 1,5 ml de tampon J

< 40 kBq

TRAC

J	Tampon (Pour la reconstitution du composant D et pour les étapes de lavage)	2 flacons, 250 ml chacun, prêts à l'emploi
---	-----------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------

**BUF D**

L	Anti-IgG humaine (contient un agent co-précipitant)	2 flacons lyophilisés, 2,5 ml chacun, prêts à l'emploi
---	-----------------------------------------------------	--------------------------------------------------------

**PRE**

0	Sérum de contrôle négatif	1 flacon de 0,5 ml, prêt à l'emploi
---	---------------------------	-------------------------------------

**CAL**

1 - 4	Calibrateurs Anti-IAA (sérum humain) Conc. : se référer à la feuille jointe	4 flacons lyophilisés Reconstituer chaque flacon dans 0,25 ml d'eau distillée
-------	--------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------

**CAL**

CI - CII	Sérum de contrôle anti-IAA (sérum humain) Concentrations : se référer à la feuille jointe	2 flacons lyophilisés Reconstituer chaque flacon dans 0,25 ml d'eau distillée
----------	----------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------

**CONTROL**

### Matériel nécessaire non fourni

- Micropipettes de 20 – 100 µl, 1000 µl
- Cônes pour micropipettes
- Eau distillée ou déionisée
- Papier absorbant
- Vortex
- Compteur gamma

### Format et conservation

CentAK anti-IAA a été conçu pour 100 déterminations. Il permet l'analyse de 41 échantillons sériques inconnus, la réalisation de la gamme d'étalonnage et la détermination des contrôles en double.

La date de validité de chaque réactif est indiquée sur l'étiquette correspondante et rapportée sur l'étiquette du coffret.

A réception du coffret, tous les composants du CentAK anti-IAA doivent être conservés à 2 – 8 °C, de préférence dans son emballage d'origine.

## Préparation avant l'emploi

Porter tous les composants du kit à température du laboratoire avant utilisation pour le dosage. Veiller à agiter gentiment les échantillons sériques afin d'assurer l'homogénéité.

- D Traceur :  
Le traceur reconstitué demeure stable pendant 4 semaines à 2 – 8 °C. Pour un stockage à long terme, une conservation à -20°C est nécessaire.
- 0 Contrôle négatif :  
Le contrôle négatif peut également être utilisé comme calibrateur 0 ; dans ce cas on lui attribuera une concentration arbitraire de 0,04 U/ml pour faciliter le calcul informatique des résultats.

Les calibrateurs et les contrôles après reconstitution sont stables pendant un maximum de 2 mois à 2-8°C.

## PROTOCOLE DE DOSAGE

Utiliser uniquement des tubes à fond rond.

1. Numérotter les tubes de façon appropriée.
2. Distribuer dans les tubes correspondants au schéma
  - 20 µl de sérum de contrôle négatif ou
  - 20 µl de calibrateurs ou
  - 20 µl de sérums de contrôle ou
  - 20 µl des échantillons sériques des patients
3. Ajouter 25 µl de traceur (préparé à partir de D et J) dans tous les tubes, **y compris ceux pour la radioactivité totale (tubes T)**. Les tubes T sont maintenant à mettre de côté jusqu'à la mesure de la radioactivité.
4. Incuber toute la nuit (au moins 18 heures à température ambiante 20 - 25°C).
5. Ajouter 100 µl d'anti-sérum anti-IgG (L) dans chaque tube.  
(Agiter la solution doucement avant l'utilisation)
6. Incuber 60 minutes (à 4 - 8°C).
7. Ajouter 2 ml de tampon (J) **froid (2 - 8°C)** dans chacun des tubes.
8. Vortexer les tubes et centrifuger pendant 20 minutes à une vitesse minimum de 1500 x g à 4°C.
9. Aspirer le surnageant complètement ou décanter. Pour éliminer les gouttelettes résiduelles, laisser reposer les tubes retournés (5 à 10 minutes) sur du papier absorbant en tapotant légèrement.

10. Pipeter 2 ml de tampon (J) dans chaque tube
11. Répéter les étapes 8 et 9
12. Mesurer la radioactivité de tous les tubes y compris des tubes T. Temps de comptage recommandé : 1 minute.

## CALCUL DES RÉSULTATS

Pour de meilleurs résultats nous recommandons d'utiliser une transformation log/log.

La courbe d'étalonnage est établie en reportant les valeurs moyennes en cpm du sérum de contrôle négatif et des calibrateurs 1 – 4 en ordonnée (axe y, échelle linéaire) en fonction des valeurs respectives des concentrations en anti-IAA en abscisse (axe x, échelle logarithmique).

Les concentrations en anti-IAA des contrôles et des échantillons inconnus sont déterminées directement en U/ml à partir de leur valeur respective en cpm.

Les valeurs correspondantes des pourcentages de liaison B en relation avec l'activité totale B/T (%) peuvent être également utilisées pour construire la courbe d'étalonnage.

Les données peuvent également être interprétées à l'aide d'un logiciel adapté utilisant un mode de lissage spline compatible avec les dosages immunoradiométriques (IRMA).

## Exemple de courbe d'étalonnage

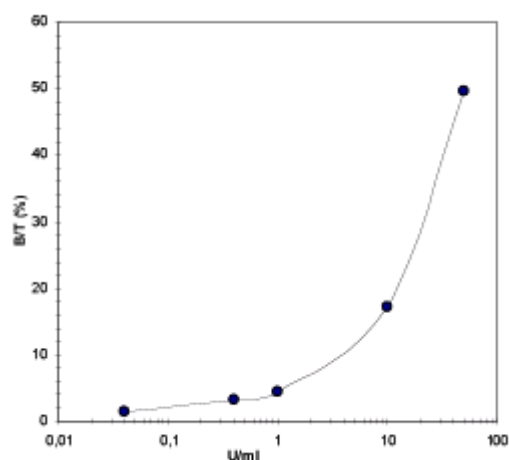
(approximativement 4 semaines avant la date d'expiration)

**A ne pas utiliser lors des tests !**



tubes	cpm (a)	cpm (b)	cpm moy.	B/T (%)	U/ml
Radioactivité totale T	28153	29138	28646	100	
Contrôle nég.	392	403	398	1,4	<b>0,04</b>
Calibrateur 1	901	945	923	3,2	<b>0,4</b>
Calibrateur 2	1199	1256	1228	4,3	<b>1</b>
Calibrateur 3	5001	4799	4900	17,1	<b>10</b>
Calibrateur 4	13997	14463	14230	49,7	<b>50</b>
Contrôle I	---	---	---	---	---
Contrôle II	---	---	---	---	---
Patient 1	5990	5777	5884	20,6	<b>13,3</b>

## Courbe d'étalonnage



## VALEURS DE REFERENCE

CentAK anti-IAA	
Anticorps anti-IAA négatifs	< 0,4 U/ml
Anticorps anti-IAA positifs	≥ 0,4 U/ml

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs normales et pathologiques. De ce fait, les valeurs ci-dessus sont données uniquement à titre indicatif.

## DONNEES ANALYTIQUES

### Calibration

Les unités du CentAK anti-IAA sont des unités arbitraires.

### Parallélisme des calibrateurs et des échantillons sériques

Des tests de dilution peuvent être effectués en diluant des échantillons positifs dans du sérum ne contenant pas d'anticorps anti-IAA. Toutefois, en raison de la nature hétérogène de la population d'anticorps dans le sérum humain et au vu de la spécificité et la sensibilité des épitopes des anticorps, les résultats obtenus peuvent ne pas correspondre aux valeurs théoriques attendues.

### Spécificité

La grande pureté du traceur ( $^{125}\text{I}$ -Insuline mono-iodée) permet de garantir que seuls les anticorps anti-IAA vont réagir et qu'aucune réaction croisée avec les anticorps anti-GAD<sub>65</sub>, anti-thyroglobuline, anti-thyroperoxydase, anti-TSH récepteur, anti-acétylcholine récepteur ou anti-IA<sub>2</sub> n'est possible.

### Sensibilité (limite de détection)

La définition la plus appropriée et statistiquement acceptable de la concentration minimale détectable de tout dosage est à présent la sensibilité fonctionnelle du dosage.

La sensibilité fonctionnelle représente généralement la concentration la plus faible pour laquelle la répétabilité (précision intra-essai) est de 10% et la reproductibilité (précision inter-essai) est de 20%. Dans des conditions correctes d'utilisation du CentAK anti-IAA, la valeur de sensibilité se situe à 0,2 U/ml.

En conséquence, les valeurs d'anti-IAA inférieures à ce seuil ne répondent pas aux critères statistiques de fiabilité définis par les bonnes pratiques de laboratoire, et ne peuvent pas être distinguées du zéro avec une précision statistique suffisante.

Les concentrations en anti-IAA supérieures à 0,2 U/ml sont considérées comme tout à fait valides.

### Précision

Répétabilité			Reproductibilité		
Échantillon	Conc. moyenne (U/ml)	CV (%)	Échantillon	Conc. moyenne (U/ml)	CV (%)
1	0,06	14	6	0,1	35
2	0,2	8	7	0,5	11
3	3,7	4	8	1,6	13
4	5,8	6	9	8,9	11
5	32,1	3	10	28,8	9

### Limites de la méthode

Les sujets sains doivent fournir un résultat négatif en utilisant le kit CentAK anti-IAA.


Aucun diagnostic ne doit être basé uniquement sur les résultats d'une méthode de diagnostic *in vitro*.

## PROTOCOLE RESUME

1	Numéroter les tubes	CAL 0	CAL 1 - 4	CI - CII	Patient 1, 2 etc.	T
2	Distribuer Calibrateur 0	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	
	Calibrateurs 1 - 4					
	Contrôles I - II					
	Echantillons					
3	Distribuer le traceur (préparé à partir de D et J)	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
4	Incuber*	Toute la nuit (au moins 18 heures) (à température ambiante 20 - 25°C)				
5	Distribuer l'anti-IgG humaine (L)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	
6	Incuber*	60 minutes (à 4 – 8°C)				
7	Distribuer BUFD (J) froid	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	
8	Vortexer et centrifuger	20 minutes à 1500 x g à 4 – 8°C				
9	Décantier ou aspirer le surnageant	Laisser les tubes retournés sur du papier absorbant (pendant 5 - 10 minutes)				
10	Distribuer BUFD (J) froid	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	
11	Répéter les étapes 8 et 9	20 minutes à 1500 x g				
12	Comptage de la radioactivité	Temps de comptage : 1 minute				

\* avant incubation agiter les tubes pour obtenir des conditions réactionnelles homogènes

## PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Ce coffret est destiné uniquement à un usage *in vitro*. Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
- Respecter les dates d'expiration sur les étiquettes.
- Ne pas utiliser ou mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser des réactifs d'autres fabricants.
- Eviter les temps morts durant la distribution des réactifs.
- Tous les réactifs doivent être stockés à 2 – 8 °C dans l'emballage d'origine avant toute utilisation.
-  Certains des réactifs contiennent de faible quantité d'azote de sodium (< 0,1%). Ils ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses.



- Les produits d'origine humaine ont subi un dépistage négatif vis-à-vis des anticorps anti-VIH, anti-VHC et de l'antigène HBS. Toutefois, aucun test de laboratoire ne peut garantir l'absence de ces agents viraux. Les réactifs comme les échantillons doivent donc être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.



- Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives, en respectant les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants :
  - Ne pas fumer, manger ou boire lors de la manipulation de produits radioactifs.
  - Toujours utiliser des gants de protection.
  - Ne jamais pipeter les solutions radioactives avec la bouche.
  - Chaque contamination ou perte de substance radioactive se fera en accord avec les réglementations en vigueur.
  - Nettoyer rapidement les substances radioactives renversées et bien laver la surface contaminée avec un décontaminant.