

IIFT: Diabetes mellitus Screen

Anleitung für den indirekten Immunfluoreszenztest

BESTELL-NR.	ANTIKÖRPER GEGEN	SUBSTRAT	SPEZIES	FORMAT OT x FELDER
FA 1020 FA 1020-1 FA 1020-3	Pankreasinseln (ICA) Graue Substanz (Glutamat-Decarboxylase, GAD)	Pankreas Pankreas (1 x 1) Kleinhirn	Affe Affe	10 x 03 (030) 10 x 05 (050) 10 x 10 (100) 20 x 05 (100) 20 x 10 (200)

Indikation: Das vorliegende Testsystem dient der qualitativen oder semiquantitativen In-vitro-Bestimmung humaner Antikörper der Immunglobulinklasse IgG gegen Pankreasinseln (ICA) in Patientenproben zur Unterstützung der Diagnose von Typ-I-Diabetes mellitus.

Testprinzip: Die Testfelder werden mit verdünnten Patientenproben inkubiert. Bei positiven Reaktionen binden sich spezifische Antikörper der Klassen IgA, IgG und IgM an die Antigene. Gebundene Antikörper werden in einem zweiten Inkubationsschritt mit FITC-markierten Anti-Human-Antikörpern angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Hinweis: Für den Nachweis der Autoantikörper gegen Inselzellen ist für das Patientenserum eine verlängerte Inkubationszeit von 18 Stunden einzuhalten: Dazu die Objektträger in die Aussparungen des Reagenzträgers legen, sodass die BIOCHIPS in die Tropfen der verdünnten Proben eintauchen. Diesen Ansatz zusätzlich in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubieren. Eine Verkürzung der Inkubationsdauer auf 2 Stunden ist – bei verminderter Sensitivität des Antikörpernachweises – möglich. Im anschließenden Waschschrift sollte eine Verweildauer in der mit PBS-Puffer gefüllten Küvette von 15 Minuten eingehalten werden, um Probenreste vollständig zu entfernen. Nicht entfernte Probenreste können die Konjugat-Inkubation inhibieren und somit die Sensitivität des Testsystems reduzieren (siehe S. 2 und 3).

Inhalt einer Testpackung für 50 Bestimmungen (z. B. FA 1020-1005):

Bezeichnung	Format	Symbol
1. Objektträger, bestückt mit je 5 BIOCHIPS, beschichtet mit Gefrierschnitten des Primatenpankreas	10 Stück	
2. FITC-markiertes Anti-Human-IgG (Ziege), gebrauchsfertig	1 x 1,5 ml	
3. Positive Kontrolle: Autoantikörper gegen Pankreasinseln (ICA), human, gebrauchsfertig	1 x 0,1 ml	
4. Negative Kontrolle: Autoantikörper-negativ, human, gebrauchsfertig	1 x 0,1 ml	
5. Probenpuffer (IIFT), gebrauchsfertig	2 x 4,5 ml	
6. Salz für PBS pH 7,2	2 Packungen	
7. Tween 20	2 x 2,0 ml	
8. Eindeckmedium, gebrauchsfertig	1 x 3,0 ml	
9. Deckgläser (62 mm x 23 mm)	12 Stück	
10. Testanleitung	1 Stück	---
Chargen-Bezeichnung		Lagertemperatur
In-vitro-Diagnostikum		ungeöffnet verwendbar bis

Positive Kontrolle (z. B. EUROIMMUN-Bestell-Nr. CA 1021-0101) und negative Kontrolle (z. B. EUROIMMUN-Bestell-Nr. CA 1000-0101) können nachbestellt werden. Die standardisierte Kontrolle mit JDF-Einheiten ist unter der Best.-Nr. CA 1021-0101-1 erhältlich.

Für die Durchführung des Testes werden Reagenzträger benötigt, die nicht Bestandteil des Testsatzes sind. Sie sind bei EUROIMMUN unter folgender Bestellnummer erhältlich:

- ZZ 9999-0110: Reagenzträger für Objektträger mit bis zu 10 Feldern.

Änderungen zur Vorversion sind grau unterlegt.



Inkubation (Reaktionsfelder 5 x 5 mm)

Zur Standardisierung der Analysen wurde von EUROIMMUN die **TITERPLANE-Technik** entwickelt: Die Proben oder das **Konjugat** werden zunächst auf die Reaktionsfelder eines Reagenzträgers pipettiert. Danach legt man die Objektträger von oben in die Aussparungen des Reagenzträgers, wodurch alle BIOCHIPS gleichzeitig Kontakt mit den Tropfen bekommen und die Reaktionen gestartet werden. Position und Höhe der Tropfen sind von der Geometrie des Systems genau definiert, die Proben verlaufen nicht. Da sich die Flüssigkeit in einem abgeschlossenen Raum befindet, wird keine „feuchte Kammer“ benötigt. Man kann beliebig viele Proben unter identischen Bedingungen simultan nebeneinander inkubieren.

Vorbereiten: Die Vorbereitung der Reagenzien und der Serum- bzw. Plasmaproben ist ab **Seite 4** dieser Anleitung beschrieben.

Pipettieren: Je Reaktionsfeld des Reagenzträgers **30 µl verdünnte Probe** pipettieren. Luftblasen vermeiden. Vor Beginn der Inkubation alle Proben des gesamten Testansatzes auftragen (bis zu 200 Tropfen). Pipettierschablone benutzen.

Inkubieren: Objektträger in die Aussparungen des Reagenzträgers legen. Dabei tauchen die BIOCHIPS in die Tropfen ein, und die Reaktionen werden gestartet. Tropfenkontakt überprüfen und darauf achten, dass die einzelnen Tropfen nicht verlaufen. **18 h** (verkürzt 2 h, siehe „Hinweis“ auf Seite 1) bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubieren.

Waschen: Objektträger mit einem Schwall PBS-Tween abspülen (Becherglas) und ihn unmittelbar danach in eine Küvette mit PBS-Tween stellen. Dauer: **15 Minuten!** Probenreste können die Konjugatinkubation inhibieren und somit die Sensitivität des Testsystems reduzieren. Wenn verfügbar, Küvette mithilfe eines Rotationsschüttlers schütteln. Max. 16 Objektträger waschen, danach PBS-Tween durch frischen Puffer ersetzen.

Pipettieren: Je Feld des (inzwischen gereinigten) Reagenzträgers **25 µl Konjugat** pipettieren. Alle Tropfen des gesamten Testansatzes auftragen, bevor weiterinkubiert wird. Multipipette verwenden. Das Konjugat ist vor der Entnahme des benötigten Aliquots zu durchmischen. Das Konjugat kann – um Zeit zu sparen – während der Inkubation mit der verdünnten Probe auf separate Reagenzträger getropft werden.

Inkubieren: Objektträger einzeln aus der Küvette nehmen, dann jeweils innerhalb von 5 Sekunden Rückseite und Unterkante mit einem Papiertuch abtrocknen und wieder so in die Aussparungen des Reagenzträgers legen, dass die BIOCHIPS in die Tropfen eintauchen. Tropfenkontakt überprüfen und **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren. Die Bereiche zwischen den Feldern sollen vor dieser Inkubation nicht abgetrocknet werden. Ab jetzt direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.

Waschen: Küvette mit frischem PBS-Tween füllen. Objektträger mit einem Schwall PBS-Tween abspülen (Becherglas) und ihn unmittelbar danach in die Küvette stellen. Dauer: **5 Minuten**. Wenn verfügbar, Küvette mithilfe eines Rotationsschüttlers schütteln. Max. 16 Objektträger waschen, danach PBS-Tween durch frischen Puffer ersetzen.

Eindecken: Eindeckmedium auf Deckglas tropfen (maximal **10 µl je Feld**; Styropor-Eindeckhilfe benutzen). Objektträger aus der Küvette nehmen, Rückseite und alle vier Kanten mit einem Papiertuch abtrocknen und, mit den BIOCHIPS nach unten, auf das betroffene Deckglas legen. Sofort prüfen, ob das Deckglas in der Aussparung des Objektträgers eingerastet ist, andernfalls Sitz korrigieren.

Auswerten: Fluoreszenz mit dem Mikroskop beurteilen.
Allgemeine Empfehlung: Objektiv 20x (Gewebeschnitte, infizierte und transfizierte Zellen), 40x (Zellsubstrate).
Anregungsfilter: 450 – 490 nm, Farbteiler: 510 nm, Sperrfilter: 515 nm.
Lichtquelle: Quecksilberdampf Lampe, 100 W, EUROIMMUN-LED, EUROStar-Bluelight.



TITERPLANE-Technik



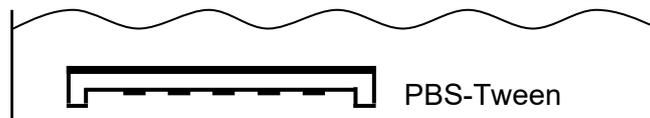
Pipettieren: 30 µl je Feld



Inkubieren: 18 h,
(verkürzt: 2 h)



Waschen: 1 s spülen
15 min Küvette



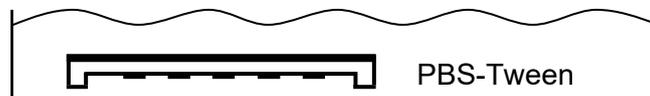
Pipettieren: 25 µl je Feld



Inkubieren: 30 min



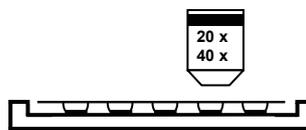
Waschen: 1 s spülen
5 min Küvette



Eindecken: max. 10 µl je Feld



Auswerten: Fluoreszenzmikroskop



Automatisierte Inkubation: Der Testsatz kann mit einem Automaten, z. B. IF Sprinter, Sprinter XL, EUROLabLiquidHandler oder anderen, inkubiert werden. Die programmierten Inkubations- und Waschbedingungen sollten denen aus der Testanleitung entsprechen. Die Testbedingungen für EUROIMMUN-Produkte werden in Kombination mit dem Testsatz validiert. Alle anderen Kombinationen müssen vom Benutzer validiert werden. Weitere Informationen finden Sie in der Gebrauchsanleitung des Geräts.



Vorbereitung und Haltbarkeit der Reagenzien

Hinweis: Wenn im nachfolgenden Text nicht anders beschrieben, sind die Reagenzien nach dem erstmaligen Öffnen bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar, wenn sie bei +2 °C bis +8 °C gelagert und vor Kontamination geschützt werden.

- **Objektträger:** Gebrauchsfertig. Schutzhülle erst öffnen, wenn die Objektträger Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) angenommen haben (Kondenswasser kann das Substrat schädigen). BIOCHIPs nicht berühren. Bei beschädigter Schutzhülle darf der Objektträger nicht mehr zur Diagnostik verwendet werden.
- **FITC-markierter Sekundärantikörper:** Gebrauchsfertig. Vor dem ersten Gebrauch gründlich durchmischen. Das Konjugat ist lichtempfindlich. Vor Sonnenlicht **schützen**.
- **Positive und negative Kontrolle:** Gebrauchsfertig. Vor dem ersten Gebrauch gründlich durchmischen.
- **PBS-Tween:** 1 Packung „Salz für PBS“ wird in 1 Liter destilliertem Wasser (besser: Aqua pro infusione, Aqua ad injectabilia) aufgelöst und mit 2 ml Tween 20 versetzt (20 Minuten rühren, schlierenfrei). Das fertig angesetzte PBS-Tween ist bei +2 °C bis +8 °C in der Regel 1 Woche lang haltbar. Das PBS-Tween darf nicht mehr verwendet werden, wenn darin eine Trübung oder Kontaminationen festzustellen sind.
- **Probenpuffer:** Gebrauchsfertig. Vor dem ersten Gebrauch gründlich durchmischen.
- **Eindeckmedium:** Gebrauchsfertig.
- **Reagenzträger:** Die Reaktionsfelder des Reagenzträgers müssen hydrophil, die Umgebung hydrophob sein, ggf. 12 Stunden in 2%igem Deconex 11 universal (EUROIMMUN-Bestell-Nr. ZZ 9912-0101) einlegen, abschließend mit viel Wasser waschen und abtrocknen. Reinigung: Reagenzträger mit 5%igem Extran MA 01 (EUROIMMUN-Bestell-Nr. ZZ 9911-0130) abreiben und mit viel Wasser abspülen. Desinfektion: Reagenzträger mit Mikrozid AF (EUROIMMUN-Bestell-Nr. ZZ 9921-0125) gründlich einsprühen und umdrehen. 5 Minuten einwirken lassen. Anschließend mit viel Wasser abspülen und abtrocknen.

Lagerung und Haltbarkeit: Die Objektträger und Reagenzien sind bei Temperaturen zwischen +2 °C und +8 °C aufzubewahren. Ungeöffnet sind die Testsatzkomponenten bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Entsorgung: Patientenproben, Kontrollen und Objektträger sind wie infektiöser Abfall zu handhaben. Alle Reagenzien sind nach den gesetzlichen Vorschriften zu entsorgen.

Warnung: Die mit den Antigen substraten beschichteten BIOCHIPs wurden mit einem desinfizierenden Fixiermittel behandelt. In den Kontrollen ließen sich mit Enzymimmuntests oder indirekter Immunfluoreszenz weder HBsAg noch Antikörper gegen HIV-1, HIV-2 und HCV nachweisen. **Dennoch sollte man mit allen Testkomponenten ebenso vorsichtig umgehen wie mit infektiösem Material.** Einige der Reagenzien enthalten außerdem Natriumazid in nicht deklarationspflichtiger Konzentration, Hautkontakt ist zu vermeiden.



Vorbereitung und Haltbarkeit der Proben

Probenmaterial: Humanes Serum sowie EDTA-, Heparin- oder Citrat-Plasma.

Haltbarkeit: Die zu untersuchenden Patientenproben können in der Regel bei +2 °C bis +8 °C bis zu 14 Tage aufbewahrt werden. Verdünnte Proben müssen innerhalb eines Arbeitstages inkubiert werden.

Empfohlene Probenverdünnung bei qualitativer Testauswertung: Die zu untersuchenden Patientenproben werden im Verhältnis 1:10 mit Probenpuffer* verdünnt (Bsp.: 11,1 µl Probe in 100 µl Probenpuffer* aufnehmen und gründlich mischen, z. B. 4 Sekunden Vortex).

Empfohlene Probenverdünnung bei semiquantitativer Testauswertung: Die Verdünnung der zu untersuchenden Patientenproben erfolgt mit Probenpuffer*. Je 100 µl Probenpuffer* in die Röhrchen vorgeben und mit 11,1 µl der nächsthöheren Konzentration gründlich mischen (z. B. 2 Sekunden Vortex). EUROIMMUN empfiehlt, Proben ab der Verdünnung 1:10 zu inkubieren.

Verdünnung	Verdünnungsschema	
1:10	100 µl Probenpuffer* + 11,1 µl unverdünnte Probe	
1:100	100 µl Probenpuffer* + 11,1 µl 1:10 verdünnte Probe	
1:1000	100 µl Probenpuffer* + 11,1 µl 1:100 verdünnte Probe	
⋮	⋮	

***Probenpuffer:** EUROIMMUN empfiehlt bei einer Inkubationsdauer von mehr als 30 Minuten, die Patientenproben mit Probenpuffer statt mit PBS-Tween zu verdünnen. Eine mögliche Lyse des Gewebeschnittes wird dadurch im Wesentlichen unterbunden.

Testauswertung

Fluoreszenzbild (positive Reaktion): Für den Nachweis der Autoantikörper gegen Inselzellen werden Gefrierschnitte des Primatenpankreas eingesetzt. Antikörper gegen Inselzellen reagieren mit dem endokrinen Anteil des Pankreasgewebes und werden durch eine glatte bis körnige cytoplasmatische Fluoreszenz der Inselzellen sichtbar. Im Wesentlichen ergibt sich das gleiche Bild wie beim positiven Kontrollserum.

Autoantikörper gegen **Glutamat-Decarboxylase (GAD)** reagieren mit dem Stratum granulosum und in abgeschwächter Form mit dem Stratum moleculare des Kleinhirns. Die Körnerschicht und die Molekularschicht werden sehr feingranuliert cytoplasmatisch angefärbt. Die Körnerschicht zeigt eine (stärkere) „leopardenfellähnliche“ Fluoreszenz, die Molekularschicht eine (schwächere) gleichmäßige Fluoreszenz, unter Aussparung der Zellkerne. Im Wesentlichen ergibt sich das gleiche Bild wie bei den positiven Kontrollseren.

Fluoreszieren die Kerne oder das Cytoplasma aller Zellen eines Reaktionsfeldes, so liegen Autoantikörper gegen Zellkerne, Mitochondrien oder andere Zellbestandteile vor.

Zeigt die positive Kontrolle keine spezifische Fluoreszenz oder die negative Kontrolle eine deutliche spezifische Fluoreszenz, dürfen die Ergebnisse nicht verwendet werden und der Test ist zu wiederholen.



EUROIMMUN stellt auf seiner Internetseite (www.euroimmun.de) ein großes Spektrum an Fluoreszenzbildern aus.

Empfohlene qualitative Auswertung:

Anti-Inselzellen-Reaktivität (IgG)	Bewertung
Keine Reaktion bei 1:10	Negativ. Keine Antikörper gegen Inselzellen des Pankreas in der Patientenprobe nachweisbar.
Positive Reaktion bei 1:10	Positiv. Hinweis auf Insulinabhängigen Diabetes mellitus.

Anti-GAD-Reaktivität (IgG)	Bewertung
Keine Reaktion bei 1:10	Negativ. Keine Antikörper gegen Glutamat-Decarboxylase (GAD) in der Patientenprobe nachweisbar.
Positive Reaktion bei 1:10	Positiv. Hinweis auf insulinabhängigen Diabetes mellitus oder das seltene Stiff-Person-Syndrom.

Empfohlene semiquantitative Auswertung: Als Titer wird diejenige Verdünnungsstufe der untersuchten Patientenprobe angegeben, bei der eine spezifische Fluoreszenz gerade noch erkennbar ist. Dabei vergleicht man mit der Reaktion, die ein gleichartig verdünntes Negativserum ergibt.

Entsprechend der nachfolgenden Tabelle lassen sich die Antikörpertiter aus den Fluoreszenzerggebnissen der unterschiedlichen Probenverdünnungen ermitteln:

1:10	Fluoreszenzerggebnis bei			Antikörpertiter
	1:100	1:1.000	1:10.000	
schwach	negativ	negativ	negativ	1:10
mittel	negativ	negativ	negativ	1:32
stark	schwach	negativ	negativ	1:100
stark	mittel	negativ	negativ	1:320
stark	stark	schwach	negativ	1:1.000
stark	stark	mittel	negativ	1:3.200
stark	stark	stark	schwach	1:10.000
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

EUROIMMUN bietet die Möglichkeit, die ermittelten ICA-Titer in JDF-Einheiten umzurechnen. Dazu ist die Kontrolle mit JDF-Einheiten separat zu bestellen (Best.-Nr.: CA 1021-0101-1) und entsprechend der mitgelieferten Gebrauchsanweisung einzusetzen.

Grenzen des Verfahrens

1. Eine Diagnose sollte nicht aufgrund eines einzelnen Testergebnisses gestellt werden. Für die Diagnose ist neben dem serologischen Befund auch immer die Klinik des Patienten zu beachten.
2. Die teilweise oder komplette Anpassung des Testsystems an den Gebrauch mit Geräten zur automatischen Probenabarbeitung oder anderen Liquid-Handling-Geräten kann zur Folge haben, dass Differenzen zwischen den mit dem Automaten und den manuell erhaltenen Ergebnissen auftreten. Es liegt in der Verantwortung jedes Labors, seine Automaten zu validieren, damit diese Testergebnisse im zulässigen Rahmen liefern.
3. Falsche Handhabung der Objektträger während der Inkubation, vor allem das Trocknen zwischen den Testschritten, kann zur Folge haben, dass das Muster „ausgewaschen“ aussieht und/oder eine starke Hintergrundfärbung entsteht.
4. Der für das Waschen benutzte Behälter sollte komplett frei von Rückständen sein. Rückstände können zu Artefakten führen.
5. Lichtquelle, Filter und die optische Einheit des Fluoreszenzmikroskops können Einfluss auf die Sensitivität des Assays haben. Beim Gebrauch von konventionellen Quecksilberdampfleuchten ist die korrekte Wartung, vor allem die Ausrichtung der Lampe und der Austausch der Lampe nach der empfohlenen Nutzungsdauer, von besonderer Bedeutung. Die EUROIMMUN-Fluoreszenzmikroskope mit LED-Blaulicht als Lichtquelle bieten viele Vorteile. Bitte setzen Sie sich für weitere Informationen mit EUROIMMUN in Verbindung.



Testcharakteristika

Antigen: Zum Nachweis der Autoantikörper gegen Inselzellen bei Diabetes mellitus (Typ I; Verwandte ersten Grades; Stoffwechsellage bei Gravidität) durch indirekte Immunfluoreszenz wird Primatenpankreas als Standardsubstrat eingesetzt.

Für den Nachweis von Antikörpern gegen Inselzellen (FA 1020-1) werden aus dem Pankreasgewebe gezielt Inselzellen „ausgeschnitten“ und auf BIOCHIPs gebracht. Auf einem Reaktionsfeld befinden sich 3 solcher BIOCHIPs, auf denen jeweils mindestens eine Inselzelle vorhanden ist. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass ausreichend Inselzellen für die ICA-Diagnostik zur Verfügung stehen.

Für den Nachweis von Autoantikörpern gegen GAD durch die indirekte Immunfluoreszenz wird Primatenkleinhirn als Standardsubstrat eingesetzt.

Messbereich: Die Startverdünnung für dieses Messsystem liegt bei 1:10. Die Probe kann mit dem Faktor 10 in den Verdünnungsstufen 1:100, 1:1.000, 1:10.000 etc. weiter verdünnt werden. Es gibt demzufolge keine obere Grenze des Messbereichs.

Reproduzierbarkeit: Inter-Chargen-, Intra-Assay- und Inter-Assay-Reproduzierbarkeit sind gewährleistet.

Kreuzreaktivität: EUROIMMUN sind keine Literaturstellen bekannt, in denen Kreuzreaktivitäten beschrieben werden. Auf Hirnschnitten alleine können neuronenspezifische Zellkernantikörper (ANNA) nicht sicher von den übrigen Zellkernantikörpern (ANA) unterschieden werden.

Substrat	Ig-Klasse	Probenspezifität (Antikörper gegen)	n	Prävalenz	
				Positiv	%
Pankreas (Affe)	IgG	ANA-positive Proben	20	0	0

Interferenzen: Hämolytische, lipämische und ikterische Proben zeigten keinen Einfluss auf das Analyseergebnis.

Hook-Effekt: Bei hochtitrigen Proben kann beim Substrat Pankreas (Affe) in seltenen Fällen in niedrigen Verdünnungen im Bereich des Cut-offs ein Hook-Effekt (Prozonen-Effekt) auftreten. Deshalb empfiehlt EUROIMMUN, die Proben in 2 unterschiedlichen Verdünnungen einzusetzen.

Referenzbereich: Titer 1:< 10

Folgende Antikörperprävalenzen wurden bei gesund erscheinenden Blutspendern (Herkunft der Proben: Deutschland) ermittelt:

Substrat	AK gegen	Konjugat	Prävalenz	Cut-off	Probenanzahl
Pankreas (Affe)	Pankreasinseln	IgG	0,5 %	1:10	200
Kleinhirn (Affe)	GAD	IgG	0 %	1:10	200



Methodenvergleich Spezifität und Sensitivität:

Pankreas (Affe)

Übersicht über die getesteten Proben / Referenz-Testsystem:	n
Vorcharakterisierte Proben INSTAND (Deutschland)*	83
Probenanzahl	83

n = 83	INSTAND	
	positiv	negativ
EUROIMMUN	67	0
IIFT Pankreas (Affe) (IgG)	0	16
Spezifität	100 %	
Sensitivität	100 %	

* Inkubationszeit im ersten Inkubationsschritt: 18 h

Spezifität und Sensitivität:

Substrat	Ig-Klasse	Referenz (Probenanzahl, Probenherkunft)	Spezifität	Sensitivität
Kleinhirn (Affe) Anti-GAD	IgG	Anti-GAD-Radioimmunassay (n = 89, Deutschland)	96 %	97 %

Klinische Bedeutung

Der Diabetes mellitus Typ I (Typ-1-Diabetes, T1DM, T1D) ist eine organspezifische Autoimmunerkrankung, die durch eine selektive Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen gekennzeichnet ist. Sowohl das Auftreten als auch die Progression der Autoimmunreaktionen werden beeinflusst durch das Zusammenwirken dreier Komponenten, nämlich der genetischen Prädisposition, einer gestörten Immunregulation und exogener Faktoren.

In der Mehrzahl der Fälle ist der T1D eine **polygene Erkrankung** genetisch belasteter Personen. Mehr als 20 verschiedene Genloci mit Assoziationen zum T1D wurden bisher beschrieben. Den weitaus bedeutendsten Einfluss auf die Diabetesentstehung hat der HLA-Genotyp. Das familiär gehäufte Auftreten von T1D kann bis zu 50 % durch das Vorhandensein bestimmter HLA-Allele erklärt werden, wobei die Genotypen HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 und HLA DR4-DQ8/DR4-DQ8 mit dem höchsten Diabetesrisiko assoziiert sind. Etwa die Hälfte der Kinder, die bereits vor dem 5. Lebensjahr T1D entwickeln, weist einen dieser Hochrisikogenotypen auf. Ca. 20 % der Kinder von Eltern, die an T1D leiden und Träger eines Hochrisikogenotyps sind, entwickeln bereits vor dem 2. Lebensjahr Inselzell-Autoantikörper.

Die wesentlichen Ziele (Autoantigene) der T1D-spezifischen Autoimmunreaktionen sind die Inselzellen (endokriner Anteil des Pankreasgewebes, cytoplasmatische Inselzellantigene), die 65-kDa-Isoform des Enzyms Glutamatdecarboxylase (GAD65), die Tyrosinphosphatase-homologen Proteine IA-2 (IA2 α und IA-2 β), der Zinktransporter 8 (ZnT8) sowie Insulin und die Insulin-Vorstufe Proinsulin. Die Reaktion des Immunsystems gegen diese Proteine der körpereigenen insulinproduzierenden Beta-Zellen kann Monate bis Jahre andauern. Der Nüchternblutzucker steigt aber erst an, wenn ca. 80 % der Beta-Zellen zerstört sind. Deshalb ist ein erweitertes Risiko-Screening unumgänglich, um frühzeitig eine Zerstörung der Beta-Zellen anzuzeigen und Aussagen zur Prognose zu machen.

Als exogene Faktoren werden „Noxen“ (Virusinfektionen, z. B. mit Coxsackie-B-, Rubi-, Echo-, Cytomegalie-, Herpes-Viren; belastende chemische Substanzen, z. B. Bafilomycine; bestimmte Nahrungsmittel etc.) und psychische Komponenten (Stress, „seelisches Leid“ etc.) diskutiert. Beispielsweise entwickeln Kinder mit familiärer T1D-Belastung zu 100 % Insel-Autoantikörper, wenn HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 vorliegt und bereits vor dem 4. Lebensmonat Kuhmilch oder glutenhaltige Nahrung konsumiert wird.



Die Unterscheidung verschiedener Diabetes-Erkrankungstypen wurde von der WHO 1965 vorgenommen, 1998 geändert, 2000 von der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) übernommen und 2009 modifiziert als Leitlinie festgelegt:

- **Typ-1-Diabetes-mellitus:**
Die Zerstörung der Beta-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas führt zum absoluten Insulinmangel.
- **Typ-2-Diabetes-mellitus:**
Er kann sich erstrecken von einer genetisch bedingten Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem absoluten Insulinmangel im späteren Krankheitsverlauf. Er ist häufig mit anderen Problemen des metabolischen Syndroms assoziiert.
- 8 andere spezifische Diabetes-Typen (z. B. Gestationsdiabetes)

Die Anzahl der Diabetes-mellitus-Patienten ist global weitgehend erfasst. 2010 litten 6,4 % der Weltbevölkerung (285 Millionen Menschen) an Diabetes, davon 10 % an T1D. Die **Inzidenz** ist weltweit im Steigen begriffen. Sie wird jährlich auf 3 % geschätzt. 2030 werden weltweit 7,7 % (ca. 640 Millionen) erkrankt sein.

In Deutschland leiden ca. 350.000 Menschen an T1D, davon ca. 15.000 Kinder und Jugendliche im Alter bis zu 14 Jahren; jährlich werden zwischen 2.100 und 2.300 Neuerkrankungen in dieser Altersgruppe registriert. Etwa 500.000 vermeintliche Typ-2-Diabetiker sind wahrscheinlich an einem T1D/LADA (latent insulinpflichtiger autoimmuner Diabetes im Erwachsenenalter) erkrankt, die ohne spezifischen Autoantikörpernachweis häufig fehldiagnostiziert und folglich nicht adäquat behandelt werden.

Das **klinische Bild** des Diabetes-mellitus-Spät syndroms beginnt mit Polyurie, Polydipsie, Nykturie, Gewichtsverlust und Müdigkeit. Die Schwere der Stoffwechsellentgleisungen wird von manifester Mikroangiopathie (Arteriosklerose des Diabetikers) beherrscht. Weiterhin können Polyendokrinopathien, Neuropathien sowie Retinopathie, diabetische Glomerulosklerose, Gangrän und diabetisches Koma als Komplikationen auftreten, die für die meist reduzierte Lebenserwartung verantwortlich sind.

Für die **serologische Diagnose** des T1D stellt die Bestimmung von spezifischen Autoantikörpern das immunologische Instrumentarium dar. Bei neu manifestiertem Diabetes ist der Autoantikörpernachweis ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung zwischen Typ-1-Diabetes und nicht-autoimmunen Diabetesformen wie Typ-2-Diabetes. Autoantikörper gegen Beta-Zell-Proteine, sogenannte Inselzellautoantikörper, sind die besten diagnostischen Marker, um einen beginnenden oder bereits bestehenden Autoimmunprozess zu erkennen und die Progression zu beobachten.

Mittels hochspezifischer und hochsensitiver serologischer Tests, wie ELISA (mit rekombinanten Proteinantigenen), RIA (Radioimmunassay mit radioaktiv markierten Autoantigenen) sowie IIFT (BIOCHIP-Mosaik mit transfizierten Zellen), können die wesentlichen Autoantikörper zum Nachweis von T1D bestimmt werden und zwar gegen:

- **GAD65** (Glutamatdecarboxylase)
Häufigkeit bei Ausbruch des T1D 70 % bis 90 %.
Die 65-kDa-Glutamat-Decarboxylase wird hauptsächlich in den Inselzellen des Pankreas synthetisiert.
Die Prävalenz ist altersunabhängig.
- **IA2** (Tyrosin-Phosphatase IA-2)
Häufigkeit bei 50 % bis 70 % der Kinder und Jugendlichen und 30 % bis 50 % der Erwachsenen.
Das 105-kD-Transmembran-Inselzell-spezifische Antigen IA2 stellt neben GAD das Hauptantigen beim T1D dar. Die Geschwindigkeit der Progression korreliert mit der Titerhöhe.
Die Prävalenz ist altersunabhängig.
- **ICA** (Inselzellen des Pankreas, zytoplasmatische Inselzellantigene)
Häufigkeit bei Ausbruch des T1D 80 %.
Im weiteren Krankheitsverlauf nehmen die Titer ab, sodass die Autoantikörper nach ca. 10 Jahren nur noch bei 10 % der Patienten nachweisbar sind.
Die Prävalenz sinkt mit steigender Krankheitsdauer.

Anmerkung:

Der Nachweis von Autoantikörpern gegen die GAD in höherer Konzentration kann als Hinweis auf ein Stiff-Person-Syndrom (früher: Stiff-Man-Syndrom) gewertet werden, eine Erkrankung mit progredienter Muskelrigidität und sekundärer Einsteifung nahezu aller Gelenke, sowie auf eine progressive Enzephalomyelitis mit Rigidität (PER).



Das initiale T1D-Autoantikörper-Screening bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen (bis etwa 25 Jahre) sollte nach Möglichkeit verschiedene Autoantikörper mittels ELISA, RIA oder IIFT bestimmen und zur Beurteilung der Autoantikörperreaktivität in angemessenen Zeitabständen (1 bis 3 Jahre, in Abhängigkeit vom Alter und Diabetesrisiko) kontrollieren, insbesondere bei Kindern und Jugendlichen, da hier Veränderungen in der Autoantikörperantwort häufiger und schneller auftreten.

Da sich beim T1D in 90 % aller Fälle bereits vor dem Zeitpunkt der klinischen Manifestation ein oder mehrere Diabetes-mellitus-assoziierte Autoantikörper im Serum feststellen lassen, können Personen mit erhöhtem Erkrankungsrisiko frühzeitig identifiziert werden. Je früher und intensiver die Autoantikörperantwort (Anzahl der positiven Inselzell-Autoantikörper, Autoantikörperaffinität, Höhe der Autoantikörpertiter), desto größer ist das Diabetesrisiko. Hohe Autoantikörpertiter sind mit einer Progression zum T1D verbunden. Die Ausweitung der Immunantwort auf weitere Zielantigene kann als qualitativ veränderte, aggressivere autoimmune Zerstörung der Beta-Zellen gewertet werden. Je früher im Leben die ersten Autoantikörper nachgewiesen werden, desto höher ist das Risiko für eine Progression der Inselzell-Autoimmunität. Von den Kindern, die bereits im 1. Lebensjahr multiple Autoantikörper aufweisen, erkranken innerhalb von 2 Jahren ca. 50 % an T1D.

Durch serodiagnostische Früherkennung und serodiagnostische Verlaufsbeobachtung der „prädiabetischen Phase“ ist eine rechtzeitige **Intervention** möglich:

1. Primärprävention zur Verhinderung von Inselzell-Autoimmunität bei Kindern mit genetischer Prädisposition
2. Sekundärprävention zur Verhinderung der Diabetesmanifestation bei Kindern und Erwachsenen mit Inselzell-Autoimmunität
3. Tertiärprävention zur Verhinderung von Spätkomplikationen bei Patienten mit T1D

Die neuen **Therapieansätze** verfolgen das therapeutische Konzept einer Modulation des Autoimmunprozesses mit langfristiger Toleranzentwicklung gegenüber Inselzellantigenen und damit Schutz der Beta-Zellen vor Zerstörung. Die aktuellen Ansätze sind zeitlich begrenzte allgemeine Immunsuppression einschließlich einer Depletion aktivierter autoreaktiver T-Zellen (z. B. Anti-CD3-Antikörper) und eine antigenspezifische Immunmodulation durch Vakzination mit einem Autoantigen (z. B. orales/intranasales Insulin).

Hinweis:

Wie eine aktuelle multizentrische Analyse von nahezu 30.000 Fällen (Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene) aus Deutschland und Österreich gezeigt hat, leiden T1D-Patienten nicht selten an weiteren Autoimmunerkrankungen. Neben T1D wurden Autoimmun-Thyreoiditis bei ca. 20 %, Zöliakie bei ca. 11 %, Autoimmun-Adrenalitis bei ca. 10 % und Autoimmun-Gastritis bei ca. 6,5 % der Erkrankten nachgewiesen. An 3 bzw. 4 Autoimmunerkrankungen gleichzeitig litten 1 % bis 2 % dieser T1D-Patienten.

Literatur

- Achenbach T, Pan L, Ziegler AG. **Frühdiagnostik bei Typ-1-Diabetes**. Diabetologe (2008) 47-58.
- Boerschmann H, Walter M, Achenbach P, Ziegler AG. **Survey of recent clinical trials of the prevention and immunointervention of type 1 diabetes mellitus**. [Article in German] Dtsch Med Wochenschr 135 (2010) 350-354.
- Decochez K, Truyen I, van der Auwera B, Weets I, Vandemeulebroucke E, de Leeuw IH, Keymeulen B, Mathieu C, Rottiers R, Pipeleers DG, Gorus FK. **Combined positivity for HLA DQ2/DQ8 and IA-2 antibodies defines population at high risk of developing type 1 diabetes**. Diabetologia 48 (2005) 687-694.
- EUROIMMUN AG. Stöcker W, Schlumberger W, Krüger C. **Alle Beiträge zum Thema Autoimmun-diagnostik**. In: Gressner A, Arndt T (Hrsg.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriums-diagnostik. 2. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2012).
- Julier C, Akolkar B, Concannon P, Morahan G, Nierras C, Pugliese A. **The Type I Diabetes Genetics Consortium 'Rapid Response' family-based candidate gene study: strategy, genes selection, and main outcome**. Genes Immun 10 (2009) 121-127.
- Krüger* C, Stöcker* W, Schlosser M. (*EUROIMMUN AG). **Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies**. Antibodies 2 (2007) 369-378.



- Rich SS, Akolkar B, Concannon P, Erlich H, Hilner JE, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Pociot F, Todd JA. **Current status and the future for the genetics of type 1 diabetes.** Genes Immun 10 (2009) 128-131.
- Stöcker* W, Schaper J, Schuhose Ch, Vieregge P, Kömpf D, Scriba PC (*EUROIMMUN AG). **Autoantibodies against cerebral gray matter in patients with insulin dependent diabetes mellitus.** Immunobiol 181 (1990) 223.
- van Deutekom AW, Heine RJ, Simsek S. **The islet autoantibody titres: their clinical relevance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and the classification of diabetes mellitus.** Diabet Med 25 (2008) 117-125.
- Vieregge P, Branczyk B, Barnett W, Stöcker* W, Soyka D, Kömpf D. (*EUROIMMUN AG). **Stiff-Man-Syndrom. Bericht über vier Fälle.** Nervenarzt 65 (1994) 712-717.
- Warncke K, Fröhlich-Reiterer EE, Thon A, Hofer SE, Wiemann D, Holl RW. **Polyendo-crinopathy in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes: a multicenter analysis of 28,671 patients from the German/Austrian DPV-Wiss database.** Diabetes Care 33 (2010) 2010-2012.
- Yu L, Liu Y, Miao D, Wenzlau J, Davidson H, Hutton J, Eisenbarth GS. **Triple chimeric islet autoantigen IA2-ZnT8WR to facilitate islet autoantibody determination.** J Immunol Methods 353 (2010) 20-23.

Anordnung der BIOCHIPs auf den Feldern:

1	2
---	---

1	2
3	4

1	2
3	4
5	6

Diese Testanleitung ist für folgende Testsysteme gültig (#### ist Platzhalter für die verschiedenen Testsatzformate wie z. B. 1005 = 10 Objektträger mit je 5 Feldern):

Best.-Nr.	Bezeichnung	BIOCHIPs je Feld						Feldgröße (mm)
		1	2	3	4	5	6	
FA 1020-####	IIFT: Pankreas (Affe)	Pankreas, Affe						5 x 5
FA 1020-####-1	IIFT: Pankreas (Affe)	Pankreas, Affe	Pankreas, Affe	Pankreas, Affe				5 x 5
FA 1020-####-3	Mosaik: Pankreas (Affe)/Kleinhirn (Affe)	Pankreas, Affe	Kleinhirn, Affe					5 x 5