

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung AAK gegen Pankreasinseln Immunfluoreszenz	Dokument: SA-SE-ICA Version: B Seite: 1/6
--	--	---

Änderungshinweis	- Durchführung der Kontrollen
------------------	-------------------------------

Inhaltsverzeichnis

1.	Zweck.....	2
1.1.	Analyt.....	2
1.2.	Indikation.....	2
2.	Prinzip des Analysenverfahrens.....	2
3.	Untersuchungsmaterial	2
4.	Benötigte Geräte, Hilfsmittel und Materialien	2
4.1.	Geräte	2
4.2.	Hilfsmittel	2
4.3.	Materialien	3
5.	Durchführung	3
5.1.	Probenvorbereitung.....	3
5.2.	Kalibrierung.....	3
5.3.	Testablauf	4
5.4.	Berechnung.....	4
6.	Qualitätskontrolle	4
6.1.	Durchführung der Qualitätskontrolle.....	4
6.2.	Freigabe der Ergebnisse.....	4
7.	Beurteilung und Grenzen des Verfahrens	4
7.1.	Angabe von Präzision und Richtigkeit.....	4
7.2.	Angabe von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze	5
7.3.	Angabe von Linearität und Spezifikation	5
7.4.	Angaben zur Methodvalidierung	5
8.	Ergebnisse und Befundbericht	5
8.1.	Auswertung und Angabe des Ergebnisses	5
8.2.	Referenzbereich.....	5
9.	Hinweise und Störungen	5
10.	Referenzen	5
11.	Anlage.....	6

	erstellt	geprüft	freigegeben
Datum	24.04.12	25.04.12	26.04.12
Unterschrift			
Name	S. Arnoldt	E. Etzold	S. Arnoldt
Abteilung	QMB	Infektionsserologie	QMB

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung AAK gegen Pankreasinseln Immunfluoreszenz	Dokument: SA-SE-ICA Version: B Seite: 2/6
--	--	---

1. Zweck

1.1. Analyt

Analyt

EDV-Kürzel

- Autoantikörper gegen Pankreasinseln

ICA

1.2. Indikation

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines Insulinpflichtigen Diabetes mellitus im Kindes- und Jugendalter sind Inselzell-Antikörper in etwa 80% der Fälle und bei Erwachsenen in 70-80% nachweisbar. Nach der Manifestation der Erkrankung fällt die Prävalenz rasch ab.

2. Prinzip des Analysenverfahrens

Indirekte Immunfluoreszenz.

Gefrierschnitte des Primatengewebes werden mit verdünnten Patientenproben inkubiert.

Bei positiven Proben binden sich die spezifischen Antikörper an die Antigene. Die gebundenen Antikörper werden mit Fluorescein-markierten Anti-human-Antikörpern angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

3. Untersuchungsmaterial

Probenmaterial: Serum, EDTA-, Heparin- oder Citrat-Plasma,
Stabilität, Lagerbedingungen: bei +2°C bis +8°C -14Tage stabil

Mindestmenge: Serum, Plasma: 50 µl

Ausschlusskriterien: entfällt

4. Benötigte Geräte, Hilfsmittel und Materialien

4.1. Geräte

- Fluoreszenzmikroskop mit Bluelight PM-SE-354

4.2. Hilfsmittel

- Eppendorfpipetten
- Multipipette
- Messkolben
- Rack für Eppendorfhütchen
- Aqua dest.
- Eppendorfhütchen

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung AAK gegen Pankreasinseln Immunfluoreszenz	Dokument: SA-SE-ICA Version: B Seite: 3/6
--	--	---

- Reagenzträger
- Waschküvetten
- Kleenex
- Tablett
- Wecker
- Deckgläser

4.3. Materialien

Reagenzien (Fa. EUROIMMUN)

- Objektträger, bestückt mit BIOCHIP`s, die mit Gefrierschnitten des Primatenpankreas beschichtet sind
- Fluorescein-markiertes Anti-Human-IgG (gebrauchsfertig)
- Positives und negatives Kontrollseren (gebrauchsfertig)
- Salz für Phosphatpuffer pH 7,2
- Tween 20
- Eindeckmedium

Haltbarkeit nach Rekonstitution bzw. Öffnen

- Objektträger (verschlossen) auf Raumtemperatur bringen → nach Öffnen der Schutzhülle innerhalb von 15 min inkubieren
- Fluorescein-markiertes Anti-Human-IgG bei +2-8°C bis zum Verfallsdatum
- PBS-Tween bei +2-8°C 1 Woche haltbar
- positives und negatives Kontrollserum bei +2-8°C bis zum Verfallsdatum
- Eindeckmedium bei +2-8°C bis zum Verfallsdatum
- Objektträger (ungeöffnet) bei -20 - +8°C bis zum Verfallsdatum

Herstellung

PBS-Tween: 1 Packungen Salz für Phosphatpuffer pH 7,2 in 1 Liter Aqua dest auflösen+
2 ml Tween 20 dazu

5. Durchführung

5.1. Probenvorbereitung

Probenverdünnung: 1:10 (180 µl PBS Tween + 20 µl Serum)

5.2. Kalibrierung

entfällt

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung AAK gegen Pankreasinseln Immunfluoreszenz	Dokument: SA-SE-ICA Version: B Seite: 4/6
--	--	---

5.3. Testablauf

- **30 µl** verdünnte Proben und Kontrollen auf Reagenzträger pipettieren (Luftblasen vermeiden) → Objektträger in eine Aussparung des Reagenzträgers legen
- **18 Stunden** bei Raumtemperatur inkubieren
- Objektträger mit PBS-Tween abspülen und 15 min in eine Küvette mit PBS-Tween stellen
- **25 µl** markierten Antikörper auf Reagenzträger pipettieren
- Objektträger auf den Reagenzträger legen
- **30 min** bei Raumtemperatur inkubieren
- Objektträger mit PBS-Tween abspülen und 5 min in eine Küvette mit PBS-Tween stellen
- Objektträger aus Küvette nehmen → mit Papiertuch Rückseite und alle vier Kanten abtrocknen → 1 Tropfen (max. 10 µl pro Feld) Eindeckmedium auf Deckglas geben → danach Deckglas auf Objektträger legen

→ bei positiven Ergebnissen muss eine Titerreihe angeschlossen werden:



5.4. Berechnung

entfällt

6. Qualitätskontrolle

6.1. Durchführung der Qualitätskontrolle

- gebrauchsfertige Positiv- und Negativ-Kontrolle der Fa. Euroimmun

Stabilität: - bei 2 - 8°C im Kühlschrank bis zum angegebenen Datum haltbar

Die beiden Kontrollen werden bei jedem Ansatz mitgeführt. Die Dokumentation erfolgt in der Labor-EDV.

6.2. Freigabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden manuell in die Labor – EDV eingegeben, die Befundung auffälliger Ergebnisse erfolgt durch einen Laborarzt.

7. Beurteilung und Grenzen des Verfahrens

7.1. Angabe von Präzision und Richtigkeit

siehe Packungsbeilage „Testcharakteristika“

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung AAK gegen Pankreasinseln Immunfluoreszenz	Dokument: SA-SE-ICA Version: B Seite: 5/6
--	--	---

7.2. Angabe von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Patientenverdünnung: 1:10 → Positiv - keine obere Bestimmungsgrenze

7.3. Angabe von Linearität und Spezifikation

siehe Packungsbeilage „Testcharakteristika“

7.4. Angaben zur Methodvalidierung

siehe Packungsbeilage „Testcharakteristika“

8. Ergebnisse und Befundbericht

8.1. Auswertung und Angabe des Ergebnisses

Auswertung erfolgt mikroskopisch.

Bei positiven Reaktionen reagieren die Antikörper gegen **Inselzellen** mit dem endokrinen Anteil des Pankreasgewebes und werden durch eine glatte bis körnige cytoplasmatische Fluoreszenz aller Inselzellen sichtbar.

Fluoreszieren die Kerne oder das Cytoplasma **aller Zellen** eines Reaktionsfeldes, so liegen AAK gegen Zellkerne, Mitochondrien oder anderer Zellbestandteile vor.

Ein positiver Befund bedarf einer weiteren Abklärung → Titerreihe ansetzen

Die Angabe des Ergebnisses erfolgt als Titerstufe.

8.2. Referenzbereich

Negativ (< 1:10)

9. Hinweise und Störungen

- Objektträger lichtgeschützt aufbewahren
- Objektträger müssen verschlossen auf Raumtemperatur gebracht werden
- Fluorescein-markierten Sekundärantikörper vor Gebrauch gründlich mischen und lichtgeschützt aufbewahren
- Reagenzien unterschiedlicher Chargen nicht miteinander vermischen

10. Referenzen

L. Thomas „Labor und Diagnose“ 7. Auflage 2008 S.: 1184 ff.

Gressner, Arndt „Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik“ Band 1 2007

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung AAK gegen Pankreasinseln Immunfluoreszenz	Dokument: SA-SE-ICA Version: B Seite: 6/6
--	--	---

11. Anlage

Packungsbeilage
Fluoreszenzmuster