



EIASON[®] anti IA-2



Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörper
gegen IA-2 im Humanserum

Gebrauchsanweisung

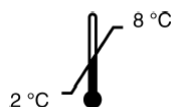
Nur für den in-vitro-Diagnostik Gebrauch

Produkt von







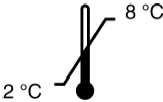













IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-113
Email: office@iason.eu
www.iason.eu

REF E05-002-96



Verwendete IFU-Symbole

Symbol	Deutsch	Symbol	Deutsch
	In vitro Diagnostikum		Standards
	Bestellnummer		Kontrollserum
	Hergestellt von		Streptavidin Peroxidase
	Lagerung bei		Verdünnungspuffer für Streptavidin Peroxidase
	Verwendbar bis		Biotin
	Europäische Konformität		Puffer für Biotin
	Chargenbezeichnung		Substrat
	Mikrotiterplatte		Stopplösung
	Reaktionsverstärker		Waschpuffer Konzentrat

Verwendungszweck

Nur für den in-vitro-Diagnostik Gebrauch.

Der EIASON® Anti-IA-2-Kit ist ein Enzym-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern gegen Protein-Tyrosinphosphatase IA-2 in Humanserum. Autoantikörper gegen Pankreas-Beta-Zell-Antigene sind wichtige serologische Marker für Typ 1 Diabetes mellitus (Typ 1 DM). Zu den von diesen

Antikörpern erkannten Antigenen gehören Insulin, Glutaminsäuredecarboxylase (GAD₆₅-kDa-Isoform) und das Inselzellantigen IA-2 oder ICA-512.

Messprinzip

Im EIASON® anti IA-2-Kit interagieren IA-2-Autoantikörper in Patientenseren, Kalibratoren und Kontrollen mit IA-2, mit welchem die ELISA-Plattenvertiefungen beschichtet sind. Nach einer Inkubation von 16 bis 20 Stunden werden die Proben verworfen, wobei IA-2-Autoantikörper an den mit IA-2 beschichteten Wells gebunden bleiben. IA-2-Biotin wird in einem zweiten Inkubationsschritt zugegeben. IA-2-Autoantikörper wirken zweiwertig und bilden somit eine Brücke zwischen dem auf der Platte immobilisierten IA-2 und IA-2-Biotin. Die Menge an IA-2-Biotin wird dann in einem dritten Inkubationsschritt durch Zugabe von Streptavidin-Peroxidase bestimmt, die spezifisch an Biotin bindet. Überschüssige, ungebundene Streptavidinperoxidase wird dann gewaschen und die Zugabe von 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) führt zur Bildung einer blauen Farbe. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Stopplösung gestoppt, wodurch die Farbe des Inhaltes der Vertiefungen von blau nach gelb wechselt. Die Extinktion des gelben Reaktionsgemisches bei 405 nm und 450 nm wird dann unter Verwendung eines ELISA-Photometer abgelesen. Eine höhere Extinktion zeigt das Vorhandensein von IA-2-Autoantikörpern in der Testprobe an. Die Messung bei 405 nm ermöglicht die Quantifizierung hoher Extinktionen (und sollte für Konzentrationen von 200 U/mL oder mehr verwendet werden). Niedrige Werte (weniger als 30 U/mL) sollten an der 450nm-Kalibrator-Kurve abgelesen werden. Der Messbereich beträgt 15- 4000 U/mL.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der EIASON® anti IA-2 Kit ist nur zur in-vitro Diagnostik und nicht zur Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben, eingesetzt werden. IASON kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden, (sofern nicht gesetzlich etwas anderes festgelegt ist), haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material menschlichen und/oder tierischen Ursprungs. Die Kitreagenzien sind so zu handhaben, als ob eine Übertragung einer Infektionskrankheit möglich sei. Rohmaterial humanen Ursprungs, das in diesem Kit zum Einsatz kommt ist negativ auf HBsAg, HCV und HIV-Antikörper geprüft. Da es kein diagnostisches Verfahren gibt, welches derartige Erreger mit 100%iger Sicherheit ausschließt, sind die entsprechenden Komponenten wie potentiell infektiöse Proben handzuhaben.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis sollten beim Gebrauch und der Entsorgung angewendet werden. Die Entsorgung der Kitreagenzien hat nach den örtlichen Vorschriften zu erfolgen.

Sicherheitsaspekte

SAPOD

Signalwort: Achtung



Gefahrenhinweis:

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Sicherheitshinweise:

P280: Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

P302 + P352: Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen

P333 + P313: Bei Hautreizung oder- ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

SUB

Signalwort: Gesundheitsschädlich, Gesundheitsgefährdend



Gefahrenhinweis:

H360: Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.

Sicherheitshinweise:

P280: Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma IASON GmbH in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde.

Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Dieser Kit ist bei vorschriftsgemäßer Lagerung bis zum Ablauf des Verfallsdatums stabil.

Nach Erhalt sind alle Reagenzien bei 2-8°C zu lagern.

Lagerung und Vorbereitung der Patientenproben

Zu analysierende Seren sollten bald nach der Trennung getestet oder gelagert werden, vorzugsweise in Teilmengen, bei oder unter –20°C. Für einen Assay reichen 100 µL aus (50 µL-Doppelbestimmung). Wiederholtes Einfrieren, Auftauen oder Erhöhung der Lagertemperatur ist zu vermeiden. Verwenden Sie keine lipämischen oder hämolysierten Serumproben. Verwenden Sie im Assay kein Plasma. Falls erforderlich, Testseren bei Raumtemperatur auftauen und vorsichtig mischen, um Homogenität zu gewährleisten. Serum vor dem Test (vorzugsweise 5 min bei 10-15.000 rpm in einer Mikrozentrifuge) zentrifugieren, um Feststoffe zu entfernen. Bitte lassen Sie diesen Zentrifugationsschritt nicht aus, wenn die Seren trüb sind oder Partikel enthalten.

Kitbestandteile

1. **MPL** mit IA-2 beschichtet (96 Wells gesamt, 8 Wells pro Streifen). Vor dem Öffnen der Mikrotiterstreifenpackung sollten diese für mind. 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) lagern. Nicht benötigte Wells in die originale Folienverpackung mit dem Trockenmittel zurückgeben, zukleben, in das Säckchen geben und gut verschließen. Aufbewahren bei 2-8°C und innerhalb von 16 Wochen verbrauchen.
2. **CAL 1** - **CAL 6** (je 0,7 mL); gebrauchsfertig: 0, 15, 60, 200, 400, 4000 U/mL (NIBSC 97/550)
3. **CO1** (0,7 mL); gebrauchsfertig: Konzentration siehe Qualitätskontroll-Zertifikat
4. **WASH** (125 mL); 10 x konzentriert: Vor Gebrauch mit Aqua dest. auf 1,25 Liter auffüllen.
5. **TURBO** (4 mL, rot); gebrauchsfertig
6. **BIOBU** (2 x 15 mL, blau); gebrauchsfertig: zur Rekonstitution von IA-2-Biotin
7. **BIO** (3 Fläschchen); lyophilisiert; jedes Fläschchen mit 5,5 mL **BIOBU** rekonstituieren; (1 Fläschchen für 4 Streifen). Am Tag der Rekonstitution verbrauchen.
8. **PODBU** (15 mL); gebrauchsfertig: zur Verdünnung von **SAPOD**
9. **SAPOD** (Streptavidin-Peroxidase; 0,7 mL) 1:20 mit **PODBU** (z.B. 0,5 mL + 9,5 mL) verdünnen. Aufbewahrung bei 2-8°C bis zu 20 Wochen nach der Rekonstitution.
10. **SUB** (Tetramethylbenzidin; TMB; 15 mL); gebrauchsfertig
11. **STOP** (0,25 M Schwefelsäure; 12 mL); gebrauchsfertig

Erforderliches Zubehör

- Pipetten mit einer Kapazität von 25 µL, 50 µL und 100 µL
- Mittel zum Messen verschiedener Volumina zum Wiederherstellen oder Verdünnen der mitgelieferten Reagenzien
- Reines Wasser
- ELISA-Photometer für 96-Well-Formate und für Messungen bei 450 nm und 405 nm
- ELISA Plate Shaker mit 500 Shakes/min (kein Orbital-Shaker)
- ELISA-Plattenabdeckung

Testdurchführung

Allgemeine Informationen

1. Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.

2. Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden. Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
3. Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
4. Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
5. Jeder Lauf muss eine Standardkurve und die Kontrollproben beinhalten.
- 6.

Testdurchführung

*Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen. **BIO** und **BIOBU** nicht vor Schritt 6 konstituieren.*

Alle **CAL**, **CO** und Proben sollten in zweifacher Ausfertigung gleichzeitig ausgeführt werden, so dass die Bedingungen für alle gleich sind.

1. 50 µL **CAL 1** – **CAL 6**, **CO 1** und Patientenproben pipettieren (Doppelbestimmung). Eine Vertiefung für den Blank freilassen.
2. 25 µL **TURBO** pipettieren (außer Blank).
3. Die Platte zukleben und ca. 5 Sekunden schütteln (bei 500 Bewegungen pro Min.).
4. Die Platte über Nacht (16–20 Stunden) bei 2–8 °C ohne schütteln inkubieren.
5. Nach der Inkubation die ELISA Platte 3x waschen. Die Flüssigkeit absaugen oder dekantieren. 300 µL verdünntes **WASH** pipettieren. Den Vorgang weitere 2x wiederholen. Die Waschlösung absaugen oder dekantieren. Die ELISA Platte auf Zellstoff gut ausklopfen (nicht notwendig, wenn ein automatischer Plattenwäscher verwendet wird).
6. 100 µL rekonstituiertes **BIO** vorsichtig pipettieren (außer Blank).
7. 1 Stunde bei **18-22°C** auf einem Schüttler inkubieren (500 Bewegungen pro Min.).
8. Nach der **BIO** Inkubation die Platte 3x mit verdünntem **WASH** wie im Punkt 5 beschrieben waschen.
9. 100 µL verdünnter **SAPOD** pipettieren (außer Blank).
10. 20 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) auf einem Schüttler inkubieren (500 Bewegungen pro Min.).
11. 3x mit verdünntem **WASH** wie in Punkt 5 beschrieben waschen. Wenn manuell gewaschen wird, führen Sie einen zusätzlichen Waschschrift mit destilliertem Wasser durch, um den Schaum zu entfernen bevor die ELISA Platte auf Zellstoff ausklopft wird.
12. 100 µL **SUB** vorsichtig pipettieren (inkl. Blank).

- 13.20 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) im Dunkeln (ohne Schütteln) inkubieren. Während der Inkubation kommt es zu einer Farbentwicklung.
14. Die Farbentwicklung wird durch vorsichtige Zugabe von 100 µL **STOP** unterbrochen (die Zugabe der Stopplösung bewirkt einen Farbumschlag von blau auf gelb, inkl. Blank). Die Platte anschließend ca. 5 Sek. schütteln. Es ist sehr wichtig sicherzustellen, dass die Substratinkubationszeit (d.h. die Zeit von der Zugabe des Substrats bis zur Zugabe der Stopplösung) für jedes Well gleich lang ist.
15. Die Absorption der Wells wird bei einer Wellenlänge von 450 nm - optional 405 nm - (Referenzfilter 620 – 650 nm) mittels Photometer innerhalb von 5 Minuten nach dem Hinzufügen der **STOP** gemessen. Blank-Wert abziehen.

oder vollautomatisiert auf:

1. **IASON® PersonalLab**
2. **IASON® Gladiator**

Ergebnisberechnung

- Eine Standardkurve anlegen, indem man die Werte der Absorption eines jeden Standards gegen die Konzentration aufträgt. So können die Konzentrationen der Patientenproben abgelesen werden.
- Alternative Auswertemethoden können verwendet werden, allerdings sollte bestätigt werden, dass der gewählte Kurvenverlauf geeignet ist und akzeptable Ergebnisse liefert. 4PL (4 Parameter Logistik) oder Point-to-Point – Auswertung werden empfohlen.
- Die Proben mit hoher IA2-Ab Konzentration können 10x mit **CAL 1** verdünnt werden. Beachten Sie bitte, dass einige Seren nicht in linearer Weise verdünnt werden.

Assay Beispieldaten

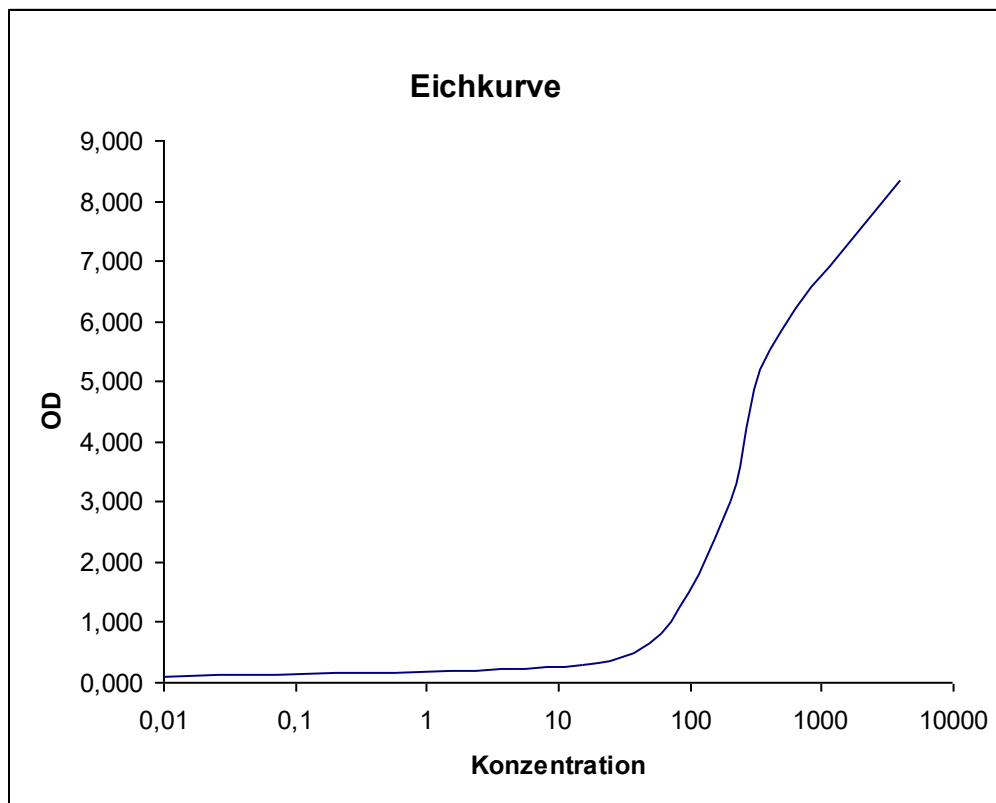
Typische Ergebnisse der EIASON® anti IA-2 Standards:

Standard	Absorption	
	450 nm	405 nm
0	0,094	0,029
15	0,290	0,085
60	0,820	0,240
200	3,00	0,890
400	5,52	1,62
4000	8,33	2,45

Diese Daten dienen nur zur Illustration und sollten nicht für die Berechnung der Probenergebnisse verwendet werden.

Absorptionswerte bei 405 nm können in 450 nm Absorptionswerte durch Multiplikation mit dem entsprechenden Faktor umgewandelt werden (3,0 im Falle von IASON Instrumenten).

Typische Eichkurve



Diese Eichkurve dient nur als Beispiel zur Illustration.

Erwartete Werte

NIBSC 97/550	
U/mL	
Negativ	<15
Positiv	≥15

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt. Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Die Ergebnisse sollten mit anderen klinischen Befunden und Observationen korrelieren.

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen.

Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Test Charakteristika

Klinische Sensitivität und Spezifität

In der DASP Studie 2005 zeigte der EIASON® anti IA-2 Kit eine Spezifität von 99% (n=100) und eine Sensitivität von 66% (n=50).

Untere Nachweisgrenze

Der CAL 1 wurde 20-mal getestet und der Mittelwert und die Standardabweichung wurden berechnet. Die untere Nachweisgrenze bei +2 Standardabweichungen betrug 0,3 U/mL.

Präzision

Inter-Assay-Präzision (n=20)			Intra-Assay-Präzision (n=25)		
Probe	Konzentration [U/mL]	VK [%]	Probe	Konzentration [U/mL]	VK [%]
A	143	3,5	A	142	3,6
B	33	6,6	B	36	5,1

Klinische Genauigkeit

Die Analyse der Patientenseren mit anderen Autoimmunerkrankungen außer 1-DM Typen zeigte keine Interferenz von Autoantikörpern gegen: Thyreoglobulin, Thyroperoxidase, Acetylcholin-Rezeptor, TSH-Rezeptor oder gegen Rheumafaktor.

Grenzen des Tests

Als Voraussetzung für zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse soll das Assayverfahren erst nach vollständigem Durchlesen und Verstehen der Packungsbeilagen und in Befolgung guter Laborpraktiken durchgeführt werden.

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

Interferenzen

Es konnten keine Interferenzen für nachfolgende aufgelistete Substanzen festgestellt werden:

- Bilirubin bis zu 20 mg/dL
- Hämoglobin bis zu 5 mg/dL

Die Interferenz mit Intralipid bei 1000 und bei 3000 mg/dL wurde beobachtet.

Rechtliche Grundlagen

Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in „Zuverlässigkeit der Ergebnisse“ genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von

Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt „Therapeutische Konsequenzen“ erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

Literatur

1. S. Chen et al. Sensitive non isotopic assays for autoantibodies to IA-2 and to a combination of both IA-2 and GAD₆₅. Clinica Chimica Acta 2005 357:74-83.
2. E. Nielsson et al. Calcium addition to EDTA plasma eliminates falsely positive results in the GADAb ELISA. Clinica chimica Acta 388 (2008) 130-134.
3. K. Rahmati et al. A Comparison of Serum and EDTA Plasma in the Measurement of Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodies (GADA) and Autoantibodies to Islet Antigen-2 (IA-2A). Using the Radioimmunoassay (RIA) and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kits. Clin. Lab.2008 54:227-335.
4. C. Törn et al. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. Diabetologia 2008 51:846-852.

Patente

Europäisches Patent EP 1 448 993 B1, chinesisches Patent ZL 02822274.1, indisches Patent 226484, japanisches Patent 5711449 und US Patente: US 8,129,132 B2, US 9,435,797 B2 und US 10,488,410 B2 finden eine Anwendung.

Arbeitsschema

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C). **BIO** und **BIOBU** nicht vor Schritt 6 rekonstituieren.

1. Pipettieren	CAL 1 – CAL 6 50 µL	CO 1 50 µL	Proben 50 µL
2. Pipettieren	TURBO	(außer Blank)	25 µL
3. Schütteln	5 Sek. auf einem Schüttler (500 Bewegungen per Min.)		
4. Inkubieren	16-20 Stunden bei 2-8°C, ohne schütteln		
5. Waschen	Waschschritt 3x : Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 300 µL verdünntes WASH pipettieren Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, auf Zellstoff abtropfen*		
6. Pipettieren	BIO	(außer Blank)	100 µL
7. Inkubieren	1 Stunde bei 18-22°C auf einem Schüttler (500 Bewegungen per Min.)		
8. Waschen	Waschschritt 3x : Siehe Punkt 5*		
9. Pipettieren	SAPOD	(außer Blank)	100 µL
10. Inkubieren	20 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) auf einem Schüttler (500 Bewegungen per Min.)		
11. Waschen	Waschschritt 3x: siehe Punkt 5*		
12. Pipettieren	SUB	(inkl. Blank)	100 µL
13. Inkubieren	20 Minuten bei Raumtemperaturen (20-25°C) im Dunkeln ohne Schütteln		
14. Pipettieren	STOP	(inkl. Blank)	100 µL
15. Schütteln	5 Sek. auf einem Schüttler (500 Bewegungen per Min.)		
16. Messen	450 nm (RF 620nm) Optional Overage Filter: 405 nm, Faktor: 3 (vom Photometer abhängig), innerhalb von 5 Min. Ergebnisberechnung: 4-Parameter oder Punkt für Punkt		

Details siehe Punkt Testdurchführung.

Normalwerte

NIBSC 97/550	
	U/mL
Negativ	<15
Positiv	≥15



EIASON® anti IA-2



Enzyme immunoassay for the quantitative determination of autoantibodies against
IA-2 in human serum

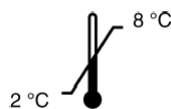
Instruction for use

For in-vitro-diagnostic use only


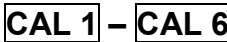




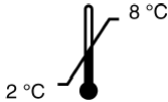













Product of



IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-113
Email: office@iason.eu
www.iason.eu



Used IFU-Symbols

Symbol	English	Symbol	English
	In vitro diagnostic device		Calibrators
	Order number		Control serum
	Product of		Streptavidin Peroxidase
	Storage		Dilution buffer for 
	Expiry date		Biotin
	European conformity		Buffer for reconstitution of 
	Batch code		Substrate
	Microplate		Stop solution
	Reaction enhancer		Concentrated wash solution

Intended use

For in-vitro-diagnostic use only.

The EIASON® anti IA-2 kit is an enzymeimmunoassay intended for the quantitative determination of autoantibodies against protein tyrosine phosphatase IA-2 in human serum. Autoantibodies to pancreatic beta cell antigens are important serological markers of type 1 diabetes mellitus (type 1 DM). The antigens recognised by these antibodies include insulin, glutamic acid decarboxylase (GAD₆₅ kDa isoform) and the islet cell antigen IA-2 or ICA-512.

Assay principle

In EIASON® anti IA-2 kit, IA-2 autoantibodies in patients' sera, calibrators and controls are allowed to interact with IA-2 coated onto ELISA plate wells. After a 16 - 20 hour incubation, the samples are discarded leaving IA-2 autoantibodies bound to the IA-2 coated wells. IA-2 Biotin is added in a 2nd incubation step where, through the ability of IA-2 autoantibodies to act divalently, a bridge is formed between the IA-2 immobilised on the plate and IA-2 Biotin. The amount of IA-2 Biotin is then determined in a third incubation step by the addition of Streptavidin Peroxidase, which binds specifically to Biotin. Excess, unbound Streptavidin Peroxidase is then washed away and addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) results in formation of a blue colour. This reaction is stopped by addition of stop solution causing the well contents to turn from blue to yellow. The absorbance of the yellow reaction mixture at 405nm and 450nm is then read using an ELISA plate reader. A higher absorbance indicates the presence of IA-2 autoantibody in the test sample. Reading at 405nm allows quantitation of high absorbances (and should be used for concentrations of 200 U/mL or more). Low values (less than 30 U/mL) should be read off the 450nm calibrator curve. The measuring range is 15 – 4000 U/mL.

Warnings and precautions

The EIASON® anti IA-2 kit is for in vitro diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in the Package Insert. IASON will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

CAUTION: this kit contains material of human and/or animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.

Source material from Human origin which is used in this kit was tested and found negative for HbsAG and HIV as well as for HCV antibodies. However, since there is no diagnostic procedure that excludes these agents with 100 percent certainty all components should be handled as potentially hazardous material.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

Safety considerations

SAPOD



Signal word: Warning

Hazard statement(s):

H317: May cause an allergic skin reaction

Precautionary statement(s):

P280: Wear protective gloves/protective clothing/ eye protection/face protection.

P302 + P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P333 + P313: If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362 + P364: Take off contaminated clothing and wash it before reuse

SUB

Signal word: Danger

**Hazard statement:**

H360: May damage fertility or the unborn child

Precautionary statement(s):

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection

Damaged test kit

In case of serious damage to the test kit or components, the company IASON must be notified in writing at least one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for the test run. They have to be stored until a final solution has been found.

Shelf life and storage of reagents

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified. Upon receipt, store all reagents at 2-8°C.

Storage and preparation of serum samples

Sera to be analysed should be assayed soon after separation or stored, preferably in aliquots, at or below -20°C. 100 µL is sufficient for one assay (duplicate 50 µL determinations). Repeated freeze thawing or increases in storage temperature must be avoided. Do not use lipaemic or haemolysed serum samples. Do not use plasma in the assay. When required, thaw test sera at room temperature and mix gently to ensure homogeneity. Centrifuge serum prior to assay (preferably for 5 min at 10-15,000 rpm in a microfuge) to remove particulate matter. Please do not omit this centrifugation step if sera are cloudy or contain particulates.

Materials provided

1. **MPL** with wells coated with IA-2 (96 wells in total, 8 wells per strip).
Ensure stripwells are firmly fitted into frame provided. After opening return any unused wells to the original foil packet with desiccant provided and seal with adhesive tape. Place foil bag in the self-seal plastic bag and store at 2-8°C for up to 16 weeks.
2. **CAL 1** - **CAL 6** (0.7 mL each); ready to use: 0, 15, 60, 200, 400, 4000 U/mL corresponding to WHO reference preparation NIBSC 97/550.

3. **CO 1** (0.7 mL); ready to use. Refer to package insert for concentration.
4. **WASH** (125 mL); concentrated: Dilute 10 X with pure water before use. Store at 2–8°C up to expiry date.
5. **TURBO** reaction enhancer (4 mL, coloured red); ready to use.
6. **BIOBU** buffer for reconstituting **BIO** (2 x 15 mL, coloured blue); ready to use.
7. **BIO** (3 vials; lyophilised; reconstitute each vial with 5 mL of **BIOBU**; 1 vial for 4 strips). Use on day of reconstitution.
8. **PODBU** Diluent for diluting **SAPOD** (15 mL); ready to use.
9. **SAPOD** (Streptavidin-peroxidase; 0.7 mL); to be diluted 1:20 with **PODBU** (e.g. 0.5 mL + 9.5 mL). Store at 2-8°C for up to 20 weeks after reconstitution.
10. **SUB** Peroxidase substrate (tetramethyl benzidine; TMB; 15 mL ready to use).
11. **STOP** Stop solution (0.5 M sulphuric acid; 12 mL); ready to use.

Materials required but not provided in the kit

- Pipettes capable of dispensing 25 µL, 50 µL and 100 µL.
- Means of measuring out various volumes to reconstitute or dilute reagents.
- Pure water.
- ELISA Plate reader suitable for 96 well formats and capable of measuring at 450 nm and 405 nm.
- ELISA Plate shaker, capable of 500 shakes/min (not an orbital shaker).
- ELISA Plate cover.

Assay procedure

General remarks

1. All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
2. Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
3. Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination
4. Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
5. As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
6. Each assay run must include a standard curve and controls.

Test procedure

Allow all reagents reach room temperature (20-25°C) before use Do not reconstitute **BIO** until step 5.

All **CAL**, **CO** and samples, and should be run in duplicate and should be run concurrently so that all conditions of testing are the same.

1. Pipette 50 µL of **CAL 1** - **CAL 6**, **CO1** and test sera into the wells (in duplicate). Leave one well empty for blank.
2. Pipette 25 µL of **TURBO** into each well (except blank).
3. Cover the frame and shake the wells containing the various samples for 5 seconds on an ELISA plate shaker with 500 shakes per min.
4. Incubate the plate for 16–20 hours at 2–8 °C without shaking.
5. After the incubation, discard the samples by briskly inverting the frame of strip wells over a suitable receptacle. Wash 3 times with 300 µL of diluted **WASH** per well and each time tap the inverted wells gently on a clean dry absorbent surface to remove any droplets of wash buffer (not necessary when an automatic plate washer is used).
6. Pipette carefully 100 µL of reconstituted **BIO** into each well(except blank).
7. Incubate for 1 hour at **18-22°C** on an ELISA plate shaker (500 shakes per min). Incubation temperature **must not** exceed 22°C)
8. After the 1 hour incubation with **BIO**, wash 3 times with diluted **WASH** as described under point 5.
9. Pipette carefully 100 µL of diluted **SAPOD** into each well(except blank).
10. Incubate for 20 minutes at room temperature (20-25°C) on an ELISA plate shaker (500 shakes per min).
11. Wash 3 times with diluted **WASH** as described under point 5. If manual washing is being carried out use one additional wash step with pure water (to remove any foam) before finally tapping the inverted wells dry.
12. Pipette carefully 100 µL of **SUB** into each well (including blank).
13. Incubate in the dark for 20 minutes at 20-25°C without shaking.
14. Stop the substrate reaction by careful addition of 100 µL of **STOP** to each well (this will cause the blue colour to turn yellow) and shake the plate for about 5 seconds on a plate shaker to ensure uniformity of the solution in each well. It is most important to ensure that the substrate incubation time (i.e. time from addition of substrate to addition of stop solution) is the same for each well.
15. Measure the absorbance of each well at 450 nm and 405 nm for cover range filter (reference 620 – 650 nm) within 5 minutes after adding the **STOP**. Subtract the blank value.

or fully automated on:

1. **IASON® PersonalLab**
2. **IASON® Gladiator**

Calculation of results

- Draw a standard curve by plotting the absorbance of each standard against its concentration. Read off the values of the test samples.

- Alternative data reduction techniques may be employed but users should confirm that the selected curve fit is appropriate and gives acceptable results. 4PL (4 parameter logistics) or point-to-point fits are recommended.
- Samples with high IA-2 Ab concentrations can be 10x diluted in **CAL 1**. Please note that some sera will not dilute in a linear way.

Sample assay data

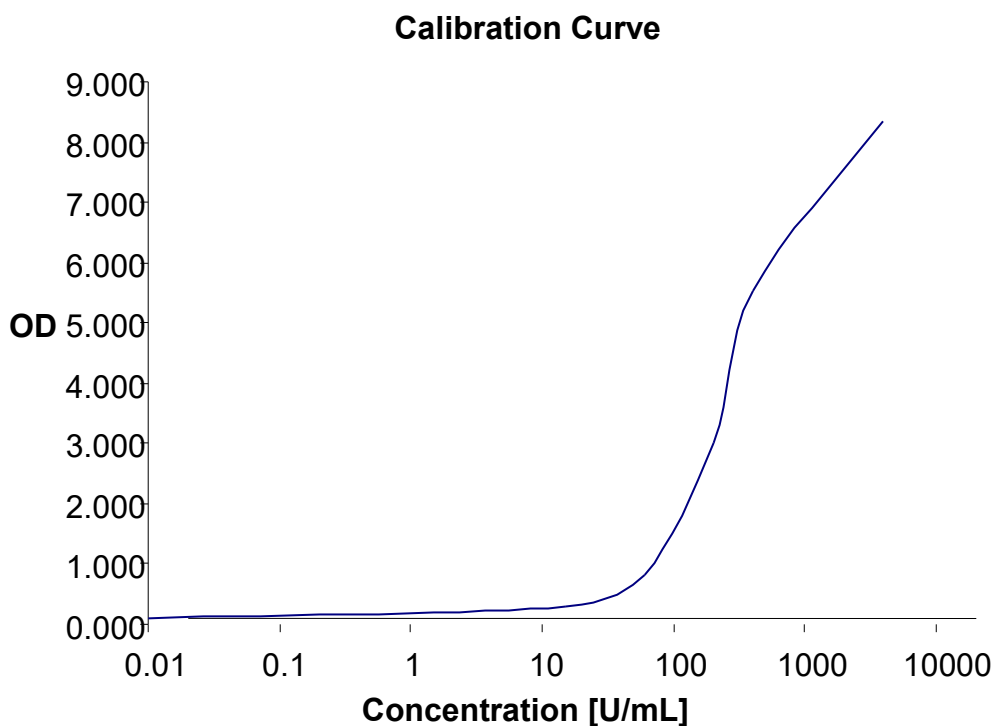
Typical results obtained with EIASON® anti IA-2 calibrators:

Calibrator U/mL	Absorbance	
	450 nm	405 nm
0	0.094	0.029
15	0.290	0.085
60	0.820	0.240
200	3.00	0.890
400	5.52	1.62
4000	8.33	2.45

This data is for illustration only and must not be used for the calculation of any sample result.

Absorbance reading at 405 nm can be converted to 450nm absorbance values by multiplying by the appropriate factor (3.0 in the case of IASON instrument).

Typical Calibration Curve



This sample calibration curve is for illustration only.

Expected Values

NIBSC 97/550	
	U/mL
Negative	<15
Positive	≥15

Each laboratory is recommended to determine ranges for their local population. The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

Quality control

The regular use of control samples at several analyte levels is advised to ensure day-to-day validity of results. Controls should be tested as unknowns. Quality Control charts should be maintained to follow the assay performance.

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or IASON GmbH directly.

Test characteristics

Clinical specificity and sensitivity

In the DASP 2005 study the IASON IA-2 Ab ELISA kit showed 99% (n=100) specificity and 66% (n=50) sensitivity.

Lower detection limit

The kit negative control was assayed 20 times, and the mean and standard deviation calculated. The lower detection limit at +2 standard deviations was 0.3 U/mL

Precision

Inter-assay-precision (n=20)			Intra-assay-precision (n=25)		
Sample	Concentration [U/mL]	CV [%]	Sample	Concentration [U/mL]	CV [%]
A	143	3.5	A	142	3.6
B	33	6.6	B	36	51

Clinical accuracy

Analysis of sera from patients with autoimmune diseases other than type 1 DM indicated no interference from autoantibodies to thyroglobulin; thyroid peroxidase; acetylcholine receptor; TSH receptor or from rheumatoid factor.

Limitation of use

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results

Interference:

No interference was observed when samples were spiked with the following materials:

- Bilirubin up to 20 mg/dL
- Haemoglobin up to 5 mg/mL

Interference was observed with Intralipid at 1000 and at 3000 mg/dL.

Legal aspects**Reliability of results**

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact IASON.

Therapeutic consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under Reliability of Results. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point Therapeutic Consequences are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

Useful publications

1. S. Chen et al. Sensitive non isotopic assays for autoantibodies to IA-2 and to a combination of both IA-2 and GAD₆₅. Clinica Chimica Acta 2005 357:74-83
2. E. Nielsson et al. Calcium addition to EDTA plasma eliminates falsely positive results in the GADAb ELISA. Clinica chimica Acta 388 (2008) 130-134
3. K. Rahmati et al. A Comparison of Serum and EDTA Plasma in the Measurement of Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodies (GADA) and Autoantibodies to Islet Antigen-2 (IA-2A). Using the Radioimmunoassay (RIA) and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kits. Clin. Lab.2008 54:227-335
4. C. Törn et al. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. Diabetologia 2008 51:846-852
5. European patent 1448 993 B1, Chinese patent ZL02822274.1, Indian patent 226484 and related patents pending in other countries apply.

Patents

The following patents apply:

European patent EP 1 448 993 B1, Chinese patent ZL 02822274.1, Indian patent 226484, Japanese patent 5711449 and US patents US 8,129,132 B2, US 9,435,797 B2 and US 10,488,410 B2.

Pipetting scheme

Allow all reagents to reach room temperature (20-25°C) before use. Do not reconstitute **BIO** until step 6 below.

1. Pipetting	CAL 1 – CAL 6 50 µL	CO 1 50 µL	Samples 50 µL
2. Pipetting	TURBO	(except blank)	25 µL
3. Shaking	5 sec. on a shaker (500 shakes per min)		
4. Incubation	16-20 hours at 2-8°C without shaking		
5. Washing	wash 3x : aspirate or decant add 300µL of diluted WASH aspirate or decant and dry on an absorbent material*		
6. Pipetting	BIO	(except blank)	100µL
7. Incubation	1 hour at 18-22°C (500 shakes per min)		
8. Washing	wash 3x : see step 5*		
9. Pipetting	SAPOD	(except blank)	100µL
10. Incubation	20 min.at room temperature (20-25°C); on a shaker (500 shakes per min)		
11. Washing	wash 3x: see step 5		
12. Pipetting	SUB	(including blank)	100µL
13. Incubation	20 minutes at room temperature (20-25°C) in the dark without shaking		
14. Pipetting	STOP	(including blank)	100µL
15. Shaking	5 sec. on a shaker (500 shakes per min)		
16. Reading	450nm (RF 620nm) Overrange Filter: 405nm, Factor: 3 (dependent on photometer), reading within 5 min. Calculation: 4-parameter or point to point		

For details, see point assay procedure

Expected Values

NIBSC 97/550	
	U/mL
Negative	<15
Positive	≥15