



EIASON[®] anti IAA

IVD

Enzymeimmunoassay für die quantitative Bestimmung von IgG Autoantikörpern gegen Insulin in humanem Serum oder Plasma.

Anleitung

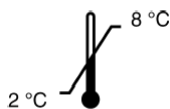
nur für den in vitro Gebrauch

Produkt von




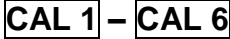


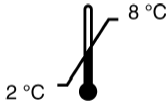










IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-113
Email: office@iason.eu
www.iason.eu

REF E05-003-96



Verwendete IFU-Symbole

Symbol	Deutsch	Symbol	Deutsch
	In Vitro Diagnosikum		Mikrotiterplatte
	Bestellnummer		Standards
	Hergestellt von		Probenbuffer
	Lagerung bei		Konjugat
	Europäische Konformität		Substrat
	Verwendbar bis		Stopplösung
	Chargenbezeichnung		Waschpuffer Konzentrat
	Kontrollsera		

Verwendungszweck

Nur für in vitro Gebrauch.

Der EIASON® anti-IAA ist ein indirekter Festphasen Enzymimmunoassay (ELISA) für die quantitative Bestimmung von IgG Antikörpern gegen Insulin in Humanserum oder Plasma.

Dieses Produkt ist ausschließlich für die professionelle Anwendung durch Fachpersonal in der in vitro Diagnostik bestimmt.

Antikörper gegen Insulin werden bei viele Patienten mit einem autoimmunen Diabetes (Typ 1) gefunden. Sie können gegen das endogene Insulin gerichtet sein, oder gegen das zu Therapie verwendete Insulin humanen oder tierischen Ursprungs.

Zusammenfassung

Der Diabetes mellitus entsteht durch eine Fehlfunktion im Glukosestoffwechsel, bedingt durch eine verminderte oder fehlende Sekretion von Insulin, wobei man die Krankheit in zwei Haupttypen untergliedert. Der Typ I (TI-DM) tritt fast immer vor dem 30. Lebensjahr auf und führt zu einer vollständigen Abhängigkeit von äußerer Insulinzufuhr.

Der Typ II ist eine Krankheit des höheren Lebensalters und geht in der Regel mit Übergewicht einher. Letzterer ist jedoch durch oral verabreichte Medikamente sowie durch richtige Ernährung unter Kontrolle zu bringen.

5 Autoantikörper sind Marker für die Beta-Zell-Autoimmunität bei Typ-1-Diabetes:

- Inselzell-Antikörper (ICA, gegen cytoplasmatische Proteine in der Beta-Zelle),
- Antikörper gegen Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD-65),
- IA-2A gegen Protein-Tyrosin-Phosphatase
- Zinktransporter-8-Autoantikörper (ZnT8A)
- Insulin-Autoantikörper (IAA)

Die ersten Autoantikörper, welche nachgewiesen werden, sind gegen Insulin oder GAD₆₅ gerichtet. Die Reihenfolge des Auftretens dieser beiden Autoantikörper hängt mit dem Alter und den genetischen Unterschieden zusammen. Die höchste Inzidenz für die Entwicklung von Insulin-Autoantikörpern liegt im Alter von 1 bis 2 Jahren. Dieser Autoantikörper tritt üblicherweise zuerst bei Kindern mit dem HLA-DR4-DQ8-Haplotyp auf.

Da das Auftreten von Insulin-Autoantikörpern vor dem 6. Lebensmonat selten ist, ist es wahrscheinlich, dass Umweltexpositionen im 1. Lebensjahr für die Ätiologie der Insulin-Autoimmunität relevant sind. Es ist möglich, dass verschiedene Faktoren an der Ätiologie von GAD₆₅-Autoantikörpern beteiligt sind, da Kinder die diese Autoantikörper zuerst entwickeln in der Regel > 1 Jahr alt sind und den HLA-DR3-DQ2-Haplotyp⁶ aufweisen. Andere Autoantikörper können sich nach Insulin- oder GAD₆₅-Autoantikörpern entwickeln: Autoantikörper, die auf Protein-Tyrosinphosphatase-ähnlichen Moleküle IA-2 und IA-2 β oder ZNT8 abzielen. Diese Proteine befinden sich in der Membran von sekretorischen Vesikeln. ZNT8 transportiert Zinkionen aus dem Zytoplasma in das Innere von sekretorischen Vesikeln. Die Funktionen von IA-2 und IA-2 β müssen jedoch noch geklärt werden.

Die diagnostischen Kriterien der American Diabetes Association (ADA) für Diabetes mellitus 2016 basieren auf Anzeichen eines abnormalen Glukosestoffwechsels, unabhängig von der Art des Diabetes und dem Alter der Kinder. Die ADA-Klassifizierung basiert auf dem Vorhandensein mindestens eines Autoantikörpers, der auf Inseln abzielt (GAD₆₅- und IA 2-Autoantikörper; es war nicht möglich, Insulin- und ZNT8-Autoantikörper einzuschließen).

Insulin-Autoantikörper (IAA) sind bei etwa 50% der Kinder mit neu auftretendem Typ-1-Diabetes vorhanden.

IAA sind bei Erwachsenen mit Typ-1-Diabetes ungewöhnlich. Aus diesem Grund wird ein IAA-Test bei Erwachsenen nicht empfohlen. IAA bei asymptomatischen Personen weist darauf hin, dass sie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Typ-1-Diabetes haben.

Messprinzip

Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sind beschichtet mit hochgereinigter Präparate aus Rinder-, Schweine- und rekombinantem Humaninsulin.

Die Bestimmung basiert auf dem Prinzip eines indirekten ELISA mit den folgenden Schritten:

Spezifische Antikörper, die in der zu untersuchenden Probe enthalten sind, binden an die Antigene, mit denen die Oberflächen der beiden Reaktionskavitäten beschichtet sind. Ein auf die anschließende Inkubation folgender Waschschrift entfernt alle nicht gebundenen oder unspezifisch gebundenen Moleküle. Das zugegebene Enzymkonjugat bindet an die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach Inkubation wird in einem zweiten Waschschrift überschüssiges Konjugat entfernt. Das Enzym Konjugat setzt zugefügtes Substrat um. Durch Zugabe von Säure entsteht ein gelb gefärbtes Endprodukt. Die Intensität der Gelbfärbung korreliert mit der Konzentration an Antigen-Antikörper-Komplexen und wird über ein optisches Modul bei 450 nm gemessen.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der EIASON® anti-IAA 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. Unser Produzent prüft humanes Rohmaterial, dass in diesem Kit zum Einsatz kommt, auf HBsAg, HCV und HIV-Antikörper. 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.

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

1. Lagerung des Kits bei 2-8°C im Dunkeln.
2. Reagenzien während der Lagerung und Anwendung nicht Hitze, Sonne oder starkem Licht aussetzen.
3. Mikrotiterplatte versiegeln und mit Trockenmittel versehen im mitgelieferten Klippbeutel lagern.

4. Die nicht geöffnete Testpackung ist bis zum Ablaufdatum der Testpackung stabil.
5. Verdünnter Waschpuffer und verdünnter Probenpuffer sind bei 2°C - 8°C mindestens 30 Tage stabil. Wir empfehlen die Gebrauchslösungen am selben Tag zu verbrauchen.

Lagerung und Vorbereitung der Patientenproben

- Blutproben sind nach den geltenden Verfahren zu gewinnen.
- Blut gerinnen lassen und Serum durch Zentrifugation gewinnen.
- Proben sollten klar und nicht hämolytisch sein. Die Verwendung hämolytischer oder lipämischer Proben sollte vermieden werden, stört diesen Test jedoch nicht.
- Serum- und Plasmaproben können gekühlt bei 2-8°C bis zu 5 Tage aufbewahrt werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtigt sollten die Proben aliquotiert werden und bei -20°C tiefgefroren werden.
- Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Die Verwendung hitzeinaktivierter Seren wird nicht empfohlen.

Patientenproben **1:100** verdünnen:

990 µL verdünnten Probenpuffer im Polystyrolröhrchen vorlegen und 10 µL Probe zugeben. Mischen.

Kitbestandteile

Alle Reagenzien 1 – 11 vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-28°C) bringen.

1. **MPL** Eine Mikrotiterplatte mit 12 Modulen mit jeweils 8 Kavitäten. Gebrauchsfertig.
2. **CAL 1** - **CAL 6** Kalibratoren; 1,5 mL je, enthalten Serum/Puffer Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN₃ 0,09%). Konzentration: 0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 U/mL; Gebrauchsfertig.
3. **NC** **PC** Kontrollen; 1,5 mL je, enthalten Insulin Antikörper in Serum/Puffer Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN₃ 0,09%); Konzentration siehe Kontrollzertifikat; Gebrauchsfertig.
4. **BU** 20 mL; Probenpuffer gelb; enthält PBS, BSA, Detergens, Konservierungsmittel NaN₃ 0,09%. Konzentrat 5x.
Vor Gebrauch den Inhalt (20 mL) einer Flasche Probenpuffer 5x-Konzentrat durch Zugabe von destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 100 mL verdünnen.
5. **CONJ** 15mL; Enzymkonjugat Lösung; rosa, enthält anti-human IgG Antikörper, POD markiert, in PBS, BSA, Detergens, Konservierungsmittel Proclin < 0,05%. Gebrauchsfertig
6. **SUB** 15mL; TMB Substrat; enthält 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin; Gebrauchsfertig
7. **STOP** 15mL; Stoplösung; enthält Säure; Gebrauchsfertig.
8. **WASH** 20mL; Waschpuffer; enthält Tris, Detergens, NaN₃ 0,09%. Konzentrat 50x.

Vor Gebrauch den Inhalt des Waschpuffer-Konzentrates (50x) mit destilliertem oder vollentsalztem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 mL verdünnen.

Erforderliches Zubehör

- Plattenphotometer mit einem optischen Filter der Messwellenlänge 450 nm; Bichromatische Messung mit Referenzwellenlänge 600-690 nm wird empfohlen.
- Auswertesoftware
- Mehrkanalpipette oder Multipette
- Vortex-Mixer
- Mikropipetten mit Einmalspitzen für 10 µL, 100 µL, 1000 µL
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- Messzylinder für 100 mL und 1000 mL
- Gefäß zur Aufbewahrung der Waschlösung

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.
3. Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
4. 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.
5. Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
6. Jeder Lauf muss eine Standardkurve und die Kontrollproben beinhalten.

Testdurchführung

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

1. Pipettieren: Dispensierung von je **100 µL** von **CAL 1** – **CAL 6**, **NC**, **PC** und vorverdünnte (1:100) Patientenproben in Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten.
2. Inkubation: **30 Minuten** bei Raumtemperatur (20 - 28°C).
3. Waschen: Kavitäten entleeren und **3x** waschen mit je **300 µL** verdünntes **WASH**.
4. Pipettieren: Dispensierung von je **100 µL CONJ** in jede Kavität.
5. Inkubation: **15 Minuten** bei Raumtemperatur.

6. Waschen: Kavitäten entleeren und 3x waschen mit je **300 µL** verdünntes **WASH**.
7. Pipettieren: Dispensierung von **100 µL SUB** in alle Kavitäten.
8. Inkubation: **15 Minuten** bei Raumtemperatur (20 - 28 °C) im Dunkeln.
9. Pipettieren: Dispensierung von je **100 µL STOP** in alle Kavitäten und für **5 Minuten** stehen lassen.
10. Messung der OD bei 450nm und Berechnung der Ergebnisse. Bichromatische Messung mit Referenzwellenlänge von 600-650nm wird empfohlen. Die Färbung ist stabil für 30 Minuten.

oder automatisiert auf:

- **IASON® Quardette**
- **IASON® PersonalLab**
- **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 direkt abgelesen werden (der 100 Verdünnungsfaktor ist in diesem Fall nicht zu berücksichtigen). Proben die über dem höchsten Standard liegen sind weiter zu verdünnen. Für die Berechnung derartiger Konzentration ist in weiterer Folge der zusätzliche Verdünnungsfaktor in die Berechnung mit einzubeziehen.
- Alternative automatisierte Auswertemethoden können verwendet werden, allerdings sollte bestätigt werden, dass der gewählte Kurvenverlauf geeignet ist und akzeptable Ergebnisse liefert. Ein Lin Log Plot wird empfohlen.

Erwartete Werte

	U/mL
negativ	<10
positiv	≥10

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen. 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.

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

Kalibrierung

Da es für diesen Assay keinen internationalen Standard gibt, ist das quantitative Messsystem in relativen Einheiten kalibriert.

Messbereich

Der Messbereich dieses ELISAs beträgt: 0 - 100 U/mL

Normalwerte

Im Rahmen einer Normbereichsstudie mit Proben von gesunden Blutspendern wurden für diesen ELISA die folgenden Werte ermittelt:

Cut-off: 10 U/mL

Linearität

Patientenproben mit hoher spezifischer Antikörperkonzentration wurden in Probenpuffer linear verdünnt, um den dynamischen Messbereich des Assays darzustellen. Die Antikörperaktivität jeder Verdünnungsstufe wurde auf einer Standardkurve mit 4-Parameter-Kurvenanpassung abgelesen.

Probe	Verdünnung	Gemessen [U/mL]	Erwartet [U/mL]	G/E [%]
1	1:100	77,6	77,6	100
	1:200	41,7	38,8	107
	1:400	21,1	19,4	109
	1:800	10,3	9,7	106
	1:1600	4,7	4,9	96
2	1:100	100,7	100,7	100
	1:200	50,7	50,4	101
	1:400	23,7	25,2	94
	1:800	11,1	12,6	88
	1:1600	5,3	6,3	84

Nachweisgrenze

Die funktionale Sensitivität wurde getestet und bestimmt mit 0,5 U/mL

Reproduzierbarkeit

Intra-Assay Präzision: Der Variationskoeffizient (CV) wurde berechnet für drei Proben mit je 24 Bestimmungen in einem Lauf. Ergebnisse der Präzision in der Serie sind in der Tabelle zusammengefasst.

Inter-Assay Präzision: Der Variationskoeffizient (CV) wurde berechnet für drei Proben aus jeweils 6 Bestimmungen in 5 Läufen. Ergebnisse der Präzision von Lauf-zu-Lauf sind in der Tabelle zusammengefasst.

Intra Assay Präzision (n=24)			Inter Assay Präzision (n=6)		
Probe	MW [U/mL]	VK [%]	Probe	MW [U/mL]	VK [%]
1	11,2	2,5	1	11,6	6,0
2	27,6	2,9	2	31,2	5,2
3	59,7	4,0	3	69,5	4,3

Studienergebnisse

Studienpopulation	n	n Pos	[%]
Diabetes mellitus Typ I	100	72	72,0
Normales Humanserum	160	2	1,3

		Klinische Diagnose		
		Pos	Neg	
EIASON® anti-IAA	Pos	72	2	260
	Neg	28	158	
		100	160	

Sensitivität: 72,0 %

Spezifität: 98,8 %

Diagnostische Effizienz: 88,5 %

Grenzen des Tests

Das Ergebnis ist eine diagnostische Hilfe. Eine endgültige klinische Diagnose sollte nicht auf dem Ergebnis eines einzelnen Tests beruhen, sie sollte durch den behandelnden Arzt unter Berücksichtigung aller klinischen und labordiagnostischen Befunde erhoben werden.

Die angegebenen Referenzbereiche für pathologische und normale Antikörperkonzentration in der Patientenprobe sollten als Empfehlung angesehen werden. Jedes Labor sollte seinen eigenen Referenzbereich etablieren nach ISO 15189 oder nach anderen anwendbaren Laborrichtlinien.

Interferenzen

Es konnten keine Interferenzen mit hämolytischen (bis 1000 mg/dL), lipämischen (bis 3 g/dL Triglyceride) oder Seren mit erhöhten Bilirubinwerten (bis 40 mg/dL) beobachtet werden. Wir empfehlen jedoch aus praktischen Gründen die Verwendung von stark hämolytischen oder lipämischen Proben zu vermeiden.

Des Weiteren wurden keine interferierenden Effekte mit Antikoagulantien (EDTA, Heparin, Citrat) 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. Reeves, W.G. Insulin Antibody Determination: Theoretical and Practical Considerations. *Diabetologia* 24, 399 (1983).
2. Atkinson, M.A., Fisk, D.D., Spillar, R.P. and MacLaren, N.K. Insulin antibodies as markers for Insulin dependent diabetes mellitus (IDD). *Diabetes* 34, 926 - 930 (1985).
3. Willein, T., Nicholson, S. and Casey, C. A Micro Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Insulin Antibodies in Serum. *J. Imm. Methods* 76, 185 (1985).
4. Kobayashi, N. et al. A Solid-Phase Enzyme Immunoassay for Anti-Insulin Antibody in Diabetes Mellitus Patients. *J. Imm. Methods* 84, 245 (1985).
5. Wisslein, T. et al. Value of Insulin Antibodies as Serum marker for Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet* 1, 480 (1985).
6. Soeldner, J.S. et al. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and Autoimmunity: islet-cell Autoantibodies and beta-cell failure. *New Engl. J. Med.* 313, 893 (1985).
7. Torfs, C.P. et al. Long Term Frozen Sera for Epidemiological Studies of Antibodies. *Lancet* 1, 503 (1986).
8. Seino, S. et al. Characterisation of Circulating Insulin in Insulin autoimmune Syndrome. *Clin. Endo. & Metab.* 62, 64 (1986).
9. Boitard, C.H. and McDewitt, H.O. Immunology of insulin-dependent diabetes mellitus. In: Cohen, J.R., (ed.) *Perspectives on autoimmunity*, 39-58 (1987). CRC Press, Boca Raton, FL
10. Witkin, T.J. Insulin Autoantibodies as markers for type I diabetes. *Endocrine Reviews*, 11, 92-104 (1990).
11. Al Alwan, I., Bin Dajim, N., Jawdat, D., Tamimi, W., Al Ahmdi, R., Albuhairan, F. Prevalence of autoantibodies in children newly diagnosed with type 1 diabetes mellitus. *Br J Biomed Sci.* 69 (1):31-3 (2012).
12. Katsarou, A. et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3, 17016 (2017).
13. Cheng, B. W. et al. Autoantibodies against islet cell antigens in children with type 1 diabetes mellitus. *Oncotarget*, 9(23), 16275–162832 (2018); doi:10.18632/oncotarget.24527

Arbeitsschema

Die Reagenzien vorher auf Raumtemperatur (20-28°C) bringen.
Alle Patientenproben 1:100 mit verdünntem **BU** verdünnen.

1. Pipettiereng	CAL 1 – CAL 6 100 µL	NC PC 100 µL	Verd. Proben 100µL
2. Inkubation	30 Minuten bei Raumtemperatur (20-28°C)		
3. Waschen	Kavitäten entleeren und 3x waschen mit je 300 µL WASH Arbeitslösung		
4. Pipettieren	CONJ		100 µL
5. Inkubation	15 Minuten bei Raumtemperatur (20-28°C)		
6. Washing	Wash 3 x: see step 3.		
7. Pipettieren	SUB		100 µL
8. Inkubation	15 Minuten bei Raumtemperatur (20-28°C)		
9. Pipettieren	STOP		100 µL
10. Messen	450nm (RF 620nm) Messen nach 5 Minuten		

Erwartete Werte

	U/mL
Negative	<10
Positive	≥10



EIASON® anti IAA



Enzyme immunoassay for the quantitative determination of IgG class autoantibodies against bovine, porcine and recombinant human insulin in human serum or plasma

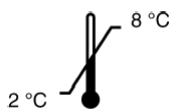
Kit instruction

For in-vitro use only




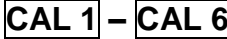


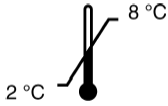








Product of



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		Microplate
	Order number		Calibrators
	Product of		Assay buffer
	Storage		Conjugate
	European Conformity		Substrate
	Expiry date		Stop Solution
	Batch code		Concentrated wash solution
	Control sera		

Intended Use

For in-vitro use only.

The EIASON® anti IAA is an indirect solid phase enzyme immunoassay (ELISA) for the quantitative measurement of IgG class autoantibodies against insulin in human serum or plasma.

The assay is intended for in vitro diagnostic use only.

Anti-insulin antibodies are found in a large part of patients with autoimmune diabetes (type 1). These antibodies may be directed against endogenous insulin or against insulin preparations of human or animal origin.

Summary

Diabetes mellitus is caused by a malfunction in glucose metabolism due to a decreased or absent secretion of insulin, whereby the disease is divided into two main types. Type I (TI-DM) almost always occurs before the age of 30 and leads to complete dependence on external insulin delivery.

The Type II is a disease of old age and is usually associated with obesity. The latter, however, is to be controlled by orally administered drugs as well as by proper nutrition.

5 autoantibodies are markers of beta cell autoimmunity in type 1 diabetes:

- Islet Cell Antibodies (ICA, against cytoplasmic proteins in the beta cell),
- antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase (GAD-65),
- IA-2A, to protein tyrosine phosphatase,
- Zinc Transporter-8 Autoantibodies (ZnT8A),
- Insulin Autoantibodies (IAA).

The first autoantibodies detected usually target insulin or GAD65; the order of appearance of these two autoantibodies is associated with age and genetic differences.

The peak incidence of insulin autoantibody development is at 1–2 years of age, and this autoantibody usually appears first in children who have the HLA DR4 DQ8 haplotype.

As the appearance of insulin autoantibodies is rare before 6 months of age, environmental exposures before 1 year of age are likely to be relevant to the etiology of insulin autoimmunity.

It is possible that different factors are involved in the etiology of GAD65 autoantibodies, as children who develop these autoantibodies first are usually >1 year of age and have the HLA DR3 DQ2 haplotype.

Other autoantibodies can develop after insulin or GAD65 autoantibodies: autoantibodies that target the protein tyrosine phosphatase-like molecules IA 2 and IA 2 β , or ZNT8.

These proteins are found in the membrane of secretory vesicles. ZNT8 transports zinc ions from the cytoplasm to the interior of secretory vesicles, but the functions of IA 2 and IA 2 β remain to be clarified.

The 2016 American Diabetes Association (ADA) diagnostic criteria for diabetes mellitus are based on signs of abnormal glucose metabolism, regardless of the diabetes type and the age of children.

ADA classification is based on the presence of at least one islet-targeting autoantibody (GAD65 and IA 2 autoantibodies; it was not feasible to include insulin and ZNT8 autoantibodies).

Insulin Autoantibodies (IAA) are present in approximately 50% of children with new-onset type 1 diabetes.

IAA are uncommon in adults with type 1 diabetes. Therefore, IAA testing in adults is not advised. IAA in asymptomatic individuals indicates they have increased risk for the development of type 1 diabetes.

Assay principle

A mixture of highly purified preparations of bovine, porcine and recombinant human insulin is bound to microwells.

The determination is based on an indirect enzyme linked immune reaction with the following steps:

Specific antibodies in the patient sample bind to the antigen coated on the surface of the reaction wells. After incubation, a washing step removes unbound and unspecifically bound serum or plasma components.

Subsequently added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen-complexes. After incubation, a second washing step removes unbound enzyme conjugate. After addition of substrate solution the bound enzyme conjugate hydrolyses the substrate forming a blue coloured product. Addition of an acid stops the reaction generating a yellow end-product.

The intensity of the yellow colour correlates with the concentration of the antibody-antigen-complex and can be measured photometrically at 450 nm.

Warnings and precautions

The EIASON® IAA ELISA 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.

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

- Store test kit at 2-8°C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store microplate sealed and desiccated in the clip bag provided.
- Shelf life of the unopened test kit is 18 months from day of production. Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.

- Diluted **WASH** and **BU** are stable for at least 30 days when stored at 2-8°C. We recommend consumption on the same day.

Storage and preparation of serum samples

1. Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
2. Allow blood to clot and separate the serum by centrifugation.
3. Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia is best avoided, but does not interfere with this assay.
4. Specimens may be refrigerated at 2-8°C for up to five days or stored at -20°C up to six months.
5. Avoid repetitive freezing and thawing of serum samples. This may result in variable loss of autoantibody activity.
6. Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

Sample preparation

Dilute all patient samples **1:100** with diluted **BU** before assay.

Therefore combine 10 µL of sample with 990 µL of **BU** in a polystyrene tube. Mix well.

Materials provided

Allow all reagents to reach room temperature (20-28°C) before use.

1. **MPL** Divisible microplate consisting of 12 modules of 8 wells each, coated with mixture of highly purified preparations of bovine, porcine and recombinant human insulin. Ready to use.
2. **CAL 1** – **CAL 6** Calibrators, 1.5 mL each, in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, NaN₃ 0.09%) containing: 0; 6.3; 12.5; 25; 50; and 100 U/mL, yellow. Ready to use.
3. **NC** **PC** Controls, 1.5mL each, containing insulin antibodies in a serum/buffer (PBS, BSA, NaN₃ 0.09%. Ready to use.
For the respective concentrations see the enclosed Quality Control Certificate.
4. **BU** Sample buffer (containing PBS, BSA, NaN₃ 0.09%), yellow, concentrate (5x).
Dilute the contents of each vial of the sample buffer concentrate (5 x) with distilled or deionized water to a final volume of 100 mL prior to use.
5. **CONJ** 1 vial, 15 mL, Enzyme conjugate solution (PBS, BSA, detergent, preservative Proclin < 0.05%), (light red) containing anti-human IgG; labelled with horseradish peroxidase. Ready to use.
6. **SUB** 1 vial, 15 mL, TMB substrate solution, colourless. Ready to use.
7. **STOP** 1 vial, 15 mL Stop solution (contains acid). Ready to use.
8. **WASH** 1 vial, 20 mL Wash solution (Tris, detergent, NaN₃ 0.09%), concentrate (50 x). Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution

concentrate (50 x) with distilled or deionized water to a final volume of 1000 ml prior to use.

Materials required but not provided in the kit

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm; optional: reference filter at 620 nm
- Data reduction software
- Multi-channel dispenser or repeatable pipette for 100 µL
- Vortex mixer
- Pipettes for 10 µL, 100 µL and 1000 µL
- Laboratory timing device
- Distilled or deionised water
- Measuring cylinder for 1000 mL and 100 mL
- Plastic container for storage of the wash solution

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

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

1. Prepare a sufficient number of microplate modules to accommodate calibrators, controls and prediluted patient samples in duplicates.
2. Pipette **100 µL** of **CAL 1**- **CAL 6**, **NC**, **PC** and prediluted patient samples in duplicate into the wells.
3. Incubate for **30 minutes** at room temperature (20 - 28 °C).
4. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with **300 µL WASH**.
5. Dispense **100 µL** of **CONJ** into each well.
6. Incubate for **15 minutes** at room temperature.

7. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with **300 µL** of **WASH**.
8. Dispense **100 µL** of **SUB** into each well.
9. Incubate for **15 minutes** at room temperature protected from light.
10. Add **100 µL** of **STOP** to each well of the modules and leave untouched for **5 minutes**.
11. Read the optical density at 450 nm (reference at 600-690 nm) and calculate the results.
12. The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read optical densities during this time.

or fully automated on:

- **IASON® Quardette**
- **IASON® PersonalLab**
- **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 directly from the standard curve (in this case the dilution factor must not to be considered). Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.
- 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.

Expected values

	U/mL
negative	<10
positive	≥10

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually. It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges. The reference ranges above should be regarded as guidelines only.

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

Calibration

This assay system is calibrated in relative arbitrary units, since no international reference preparation is available for this assay.

Measuring range

The calculation range of this ELISA assay is 0 - 100 U/mL

Expected values

In a normal range study with samples from healthy blood donors the following ranges have been established with this ELISA assay:

Cut-off : 10 U/mL

Linearity

Patient samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in sample buffer to demonstrate the dynamic range of the assay and the upper / lower end of linearity. Activity for each dilution was calculated from the calibration curve using a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates.

Sample	Dilution	Observed [U/mL]	Expected [U/mL]	O/E [%]
1	1:100	77.6	77.6	100
	1:200	41.7	38.8	107
	1:400	21.1	19.4	109
	1:800	10.3	9.7	106
	1:1600	4.7	4.9	96
2	1:100	100.7	100.7	100
	1:200	50.7	50.4	101
	1:400	23.7	25.2	94
	1:800	11.1	12.6	88
	1:1600	5.3	6.3	84

Precision (Reproducibility)

Statistics for coefficients of variation (CV) were calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run for Intra-Assay precision. Run-to-run precision was calculated from the results of 5 different runs with 6 determinations of each sample:

Intra assay cv (n = 24)			Inter assay cv (n = 6)		
Sample	Mean [U/mL]	CV [%]	Sample	Mean [U/mL]	CV [%]
1	11.2	2.5	1	11.6	6.0
2	27.6	2.9	2	31.2	5.2
3	59.7	4.0	3	69.5	4.3

Sensitivity

The lower detection limit for anti-Insulin has been determined at 0.5 U/mL.

Study results

Study population	n	n Pos	[%]
Diabetes mellitus Typ I	100	72	72.0
Normal human sera	160	2	1.3

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
EIASON® anti IAA	Pos	72	2	260
	Neg	28	158	
		100	160	

Sensitivity: 72.0 %
 Specificity: 98.8 %
 Overall agreement: 88.5 %

Limitation of use

This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

The above pathological and normal reference ranges for antibodies in patient samples should be regarded as recommendations only. Each laboratory should establish its own ranges according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.

Interferences

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dL) or lipemic (up to 3 g/dL triglycerides) sera or plasma, or bilirubin (up to 40 mg/dL) containing sera or plasma.

Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, Heparin).

However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

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.

Literature

1. Reeves,W.G. Insulin Antibody Determination: Theoretical and Practical Considerations. *Diabetologia* 24, 399 (1983).
2. Atkinson, M.A., Fisk, D.D., Spillar, R.P. and MacLaren, N.K. Insulin antibodies as markers for Insulin dependent diabetes mellitus (IDD). *Diabetes* 34, 926 - 930 (1985).
3. Willein, T., Nicholson, S. and Casey, C. A Micro Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Insulin Antibodies in Serum. *J. Imm. Methods* 76, 185 (1985).
4. Kobayashi, N. et al. A Solid-Phase Enzyme Immunoassay for Anti-Insulin Antibody in Diabetes Mellitus Patients. *J. Imm. Methods* 84, 245 (1985).
5. Wissllein, T. et al. Value of Insulin Antibodies as Serum marker for Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet* 1, 480 (1985).
6. Soeldner, J.S. et al. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and Autoimmunity: islet-cell Autoantibodies and beta-cell failure. *New Engl. J. Med.* 313, 893 (1985).
7. Torfs, C.P. et al. Long Term Frozen Sera for Epidemiological Studies of Antibodies. *Lancet* 1, 503 (1986).
8. Seino, S. et al. Characterisation of Circulating Insulin in Insulin autoimmune Syndrome. *Clin. Endo. & Metab.* 62, 64 (1986).
9. Boitard, C.H. and McDewitt, H.O. Immunology of insulin-dependent diabetes mellitus. In. Cohen, J.R., (ed.) *Perspectives on autoimmunity*, 39-58 (1987). CRC Press, Boca Raton, FL
10. Witkin,T.J. Insulin Autoantibodies as markers for type I diabetes. *Endocrine Reviews*, 11, 92-104 (1990).
11. Al Alwan, I., Bin Dajim, N., Jawdat, D., Tamimi, W., Al Ahmdi, R., Albuhairan, F. Prevalence of autoantibodies in children newly diagnosed with type 1 diabetes mellitus. *Br J Biomed Sci.* 69 (1):31-3 (2012).
12. Katsarou, A. et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3, 17016 (2017).
13. Cheng, B. W. et al. Autoantibodies against islet cell antigens in children with type 1 diabetes mellitus. *Oncotarget*, 9(23), 16275–162832 (2018); doi:10.18632/oncotarget.24527

Pipetting scheme

Allow all reagents to become room temperature (20-28°C).
Dilute all patient samples 1:100 with **BU** before assay.

1. Pipetting	CAL 1 – CAL 6	NC PC	Diluted Samples 100 µL
2. Incubation	30 minutes at room temperature (20-28°C)		
3. Washing	wash 3x : aspirate or decant add 300µl WASH aspirate or decant and dry on an absorbent material		
4. Pipetting	CONJ		100 µL
5. Pipetting	15 minutes at room temperature (20-28°C)		
6. Washing	Wash 3 x: see step 3.		
7. Pipetting	SUB		100 µL
8. Incubation	15 minutes at room temperature in the dark (20-28°C)		
9. Pipetting	STOP		100 µL
10. Reading	450nm (RF 620nm) Overrange Filter: 405nm, Factor: 3 (dependent on photometer), reading after 5 min. Calculation: 4-parameter or point to point		

Expected values

	U/mL
Negative	<10
Positive	≥10