

Assay für Antikörper gegen Insulin von RSR – Gebrauchsanweisung

RSR Limited

 Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff
 CF14 5DU United Kingdom

Tel.: +44 29 2068 9299 Fax: +44 29 2075 7770

 Email: info@rsrltd.com Website: www.rsrltd.com

 Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Fl.,
 Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta.

VERWENDUNGSZWECK

Das RSR Insulin Ab RIA Assay-Kit ist nur für die Verwendung durch Fachpersonal zur quantitativen Bestimmung von Insulin-Antikörpern (IAk) in Humanserum bestimmt. Autoantikörper gegen Pankreas-Beta-Zell-Antigene sind wichtige serologische Marker des Typ-1-Diabetes mellitus (Typ-1-DM). Zu den von diesen Antikörpern erkannten Antigenen gehören Insulin, Glutaminsäure-decarboxylase (GAD₆₅ kDa-Isoform), das Inselzellantigen IA-2 oder ICA-512 und der Zinktransporter 8 (ZnT8).

LITERATURLISTE

M. Masuda et al. Autoantibodies to IA-2 in IDDM. Measurements with a new immunoprecipitation assay.

Clinica Chimica Acta 2000 **291**; 53 - 66

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

TESTPRINZIP

Beim RSR Insulin-Antikörper (IAk)-Assay werden Serumproben zunächst mit ¹²⁵I-(A14)-monoiodiertem Insulin inkubiert. Danach folgt die Zugabe von Anti-Human-IgG, um alle vorhandenen Komplexe aus ¹²⁵I-markierten-Insulin-Anti-Insulin auszufallen. Nach dem Zentrifugieren werden die ¹²⁵I-Zerfälle pro Minute im Präzipitat bestimmt, dabei ist die Menge an Radioaktivität im Präzipitat proportional zur Konzentration von IAk in der Testprobe. Der Messbereich beträgt 0,4 – 50 E/mL (E = beliebige RSR-Einheiten).

AUFBEWAHRUNG UND VORBEREITUNG DER SERUMPROBEN

Das zu analysierende Serum sollte bald nach dem Abseren getestet werden oder, vorzugsweise aliquotiert, bis zu 7 Tage bei 2-8°C oder für einen längeren Zeitraum bei ≤ -20°C aufbewahrt werden. 40 µL sind ausreichend für einen Assay (Doppelbestimmungen mit je 20 µL). Testproben bei Bedarf bei Raumtemperatur auftauen und vorsichtig mischen, um eine homogene Durchmischung zu gewährleisten. Lipamische oder hamolytische Seren sollten nicht verwendet werden. Entfernen Sie jegliche Schwebeteilchen durch Zentrifugation vor dem Assay (vorzugsweise

für 5 min bei ca. 10.000 U/min oder ca. 10.000 x g in einer Mikrozentrifuge).

SYMBOLE

Symbol	Bedeutung
	Konformitätserklärung
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargennummer
	Gebrauchsanweisung beachten
	Hersteller
	Inhalt ausreichend für X Bestimmungen
	Ungeöffnet verwendbar bis
	Begrenzung der Lagertemperatur
	Negative Control
	Positive Control

GELIEFERTE MATERIALIEN FÜR 50 BZW 100 ROHRCHEN (Tabelle 1)

MATERIAL	IAA/50	IAA/100
¹²⁵ I-Labelled Insulin	1 x 1,5 mL	2 x 1,5 mL
Calibrators	4 x 0,25 mL	4 x 0,25 mL
Anti-Human IgG	1 x 5,5 mL	2 x 5,5 mL
Assay Buffer	1 x 250 mL	2 x 250 mL
Negative Control	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
Positive Controls	2 x 0,25 mL	2 x 0,25 mL

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

3,5 ml Testrohrchen
 Pipetten zum Dispensieren von 20 µL, 25 µL, 100 µL, 250 µL, 1,5 mL und 2 mL.
 Vortexmischer
 Gekühlte Zentrifuge (4°C) für 1500 x g
 Gammazähler
 Reinstwasser

VORBEREITUNG DER MITGELIEFERTEN REAGENZIEN

Ungeöffnete Kits und alle Kitkomponenten (A-F) bei 2-8°C lagern.

¹²⁵ I-Labelled Insulin 40kBq/Flaschchen (bei Herstellung)	
A	In jedes Flaschchen 1,5 mL Assay Buffer (D) pipettieren und vorsichtig mischen bis sich das Lyophilisat aufgelöst hat. Nach der Rekonstitution bei 2-8°C bis zu 4 Wochen haltbar.

B1-4	Calibrators 0,4; 1; 10 und 50 u/mL (= E/mL); Inhalt jeweils mit 0,25 mL Reinstwasser rekonstituieren. Nach der Rekonstitution bei 2-8°C bis zu 2 Monate haltbar. Einheiten sind von RSR willkürlich festgelegte Einheiten.
C	Anti-Human IgG (enthalt Prazipitationsverstärker) Vor Gebrauch auf einem Vortexmischer mischen. Bei 2-8°C lagern.
D	Assay Buffer Gebrauchsfertig. Bei 2-8°C lagern.
E	Negative Control Gebrauchsfertig. Bei 2-8°C lagern.
F1-2	Positive Controls I & II Inhalt jeweils mit 0,25 mL Reinstwasser rekonstituieren. Nach der Rekonstitution bei 2-8°C für bis zu 2 Monate haltbar.

TESTVERFAHREN

Alle Reagenzien, außer dem Assay Buffer (D), für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen. Jeweils vor Gebrauch gründlich mischen. Ein Mehrfachdispenser (z. B. Eppendorf Multipette®) wird für die Schritte 2, 4 und 5 empfohlen.

1.	Je 20 µL Patientenserum, Negative Control (E), Calibrators (B1-4) und Positive Controls I & II (F1-2) in Doppelbestimmung in entsprechend beschriftete Testrohrchen pipettieren.
2.	Jeweils 25 µL ¹²⁵ I-Labelled Insulin (A) in jedes Rohrchen pipettieren sowie in zwei weitere leere Rohrchen zur Bestimmung der Totalaktivität.
3.	Jedes Rohrchen kurz auf einem Vortexmischer mischen, abdecken und über Nacht (16 - 24h) bei Raumtemperatur (20 - 25°C) inkubieren.
4.	Jeweils 100 µL Anti-Human-IgG (C) in jedes Rohrchen pipettieren (außer Totalaktivität), auf dem Vortexmischer kurz mischen, abdecken und bei 2 - 8°C für 1 Stunde inkubieren.
5.	Jeweils 2 mL kalten (2 - 8°C) Assay Buffer (D) in jedes Rohrchen pipettieren (außer Totalaktivität), auf dem Vortexmischer kurz mischen und bei 1500 x g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugieren.
6.	Nach der Zentrifugation die Überstände vorsichtig absaugen oder dekantieren.
7.	Die Schritte 5 und 6 wiederholen.
8.	Bei allen Rohrchen, einschließlich die der Totalaktivität, mit einem Gammazähler 1 Minute lang die cpm bestimmen.

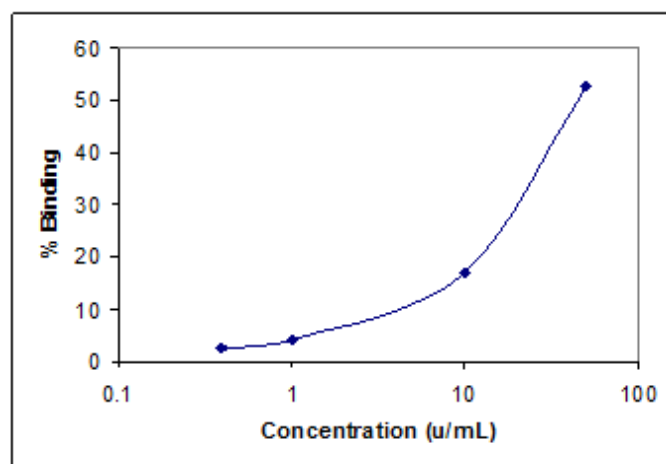
TESTAUSWERTUNG

Durch das Auftragen der Konzentration der Calibrators (B1-4) auf der x-Achse (logarithmische Skala) gegen die für die Calibrators % gebundenes ¹²⁵I-Insulin (= $\text{cpm}_{\text{Calibrator}} / \text{cpm}_{\text{Totalaktivität}} \times 100$) auf

der y-Achse (lineare Skala) kann eine Eichkurve erstellt werden. IAK-Konzentrationen in Testseren können dann von der Eichkurve abgelesen werden [aufgetragen bei RSR als Spline-Log/Lin-Kurve (Glättungsfaktor = 0)]. Andere Datenreduktionsmethoden können verwendet werden. Für eine computer-basierte Auswertung kann der Negative Control (E) ein Wert von 0,05 E/mL zugewiesen werden. Proben mit hohen Insulin Antikörper (IAK) Konzentrationen können mit der Negative Control (E) des Kits verdünnt werden. Zum Beispiel 10 µL Probe plus 90 µL Negative Control (E), um eine 10-fache Verdünnung zu erhalten. Weitere Verdünnungen können aus dieser 10-fachen Verdünnung hergestellt werden (z. B. 100x) oder in sonstiger geeigneter Weise. Hinweis: Einige Seren lassen sich nicht linear verdünnen.

TYPISCHE ERGEBNISSE (Nur als Beispiel, nicht zur Berechnung der tatsächlichen Ergebnisse verwenden)

Calibrator E/mL	% gebund. ¹²⁵ I-Insulin	Konzentration E/mL
B1	2,6	0,4
B2	4,9	1
B3	18,8	10
B4	56,9	50
Neg. Control	0,8	
Pos. Control I	3,2	0,51
Pos. Control II	20,8	11,3
Totalaktivität cpm = 30.424		



CUT-OFF

	E/mL
Negativ	< 0,4 E/mL
Positiv	≥ 0,4 E/mL

Dieser Cut-off wurde bei RSR validiert. Jedoch sollte jedes Labor seinen eigenen normal und pathologische Referenzbereiche für Insulin-Ak-Spiegel festlegen. Außerdem wird empfohlen, dass jedes Labor sein eigenes Panel an Kontrollproben im Assay mitführt.

KLINISCHE BEWERTUNG

Klinische Spezifität und Sensitivität

100% (n = 100) der Serenproben gesunder Blutspender zeigten Werte von weniger als 0,4 Einheiten pro mL. Von 62 Typ-1-DM-Patienten, die noch nie eine Insulinbehandlung erhalten hatten, waren 21 (34%) positiv für IAK. Allerdings ist bei Patienten, die eine Insulinbehandlung erhalten haben die IAK-Pravalenz noch viel höher, was darauf hindeutet, dass eine Insulinbehandlung bei vielen Patienten die Bildung von Insulin-Antikörper induziert.

Untere Nachweisgrenze

Die Negative Control wurde 20 Mal getestet und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze betrug bei einer +2 Standardabweichung 0,03 E/mL.

Inter-Assay-Präzision

Probe	E/mL (n = 20)	VK (%)
1	6,3	8,0
2	18,7	6,5

Intra-Assay-Präzision

Probe	E/mL (n = 25)	VK (%)
A	0,57	3,3
B	7,0	1,9
C	8,9	1,6

Klinische Genauigkeit

Seren von Patienten mit Morbus Basedow (n=17), Hashimoto-Thyreoiditis (n=20), Zoliakie (n=10), Systemischem Lupus Erythematodes (n=10) oder Rheumatoider Arthritis (n=10) hatten IAK-Werte von weniger als 0,4 E/mL. Dies deutet daraufhin, dass es keine Interferenz gibt durch Autoantikörpern gegen TSH-Rezeptor, Thyreoglobulin, Schilddrüsen-peroxidase, Gewebe-Transglutaminase, dsDNA oder Rheumafaktor. Diese Ergebnisse deuten auf eine Assay-Nachweisgrenze von 0,4 E/mL hin, jedoch sollten Werte zwischen 0,3 und 0,5 E/mL durch Zugabe von unmarkiertem Insulin überprüft werden (Einzelheiten auf Anfrage von RSR erhältlich).

Storfaktoren

Es wurde keine Interferenz beobachtet, wenn Proben mit bis zu 3000 mg/dL Intralipid oder 20 mg/dL Bilirubin versetzt wurden. Eine Interferenz durch Hamoglobin wurde bei 5 mg/mL beobachtet.

SICHERHEITSHINWEISE

Dieses Kit ist nur für den Gebrauch durch Fachpersonal bestimmt. Befolgen Sie die Anweisungen sorgfältig. Beachten Sie die auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten und die angegebenen Haltbarkeiten für rekonstituierte Reagenzien. Ausführlichere Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt. Das Kit enthält radioaktives Material. Benutzer sollten sich über alle nationalen und lokalen Gesetze und Verhaltenskodizes in Bezug auf die Verwendung, Lagerung, den Transport und die Entsorgung radioaktiver Materialien informieren und diese beachten. Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einer Einnahme führen könnten. Kontakt mit Haut und Kleidung vermeiden. Schutzkleidung und gegebenenfalls Personendosimeter tragen. Radioaktive Materialien sollten nur von autorisiertem Personal und in ausgewiesenen Bereichen verwendet werden. Nach der Handhabung Hände gründlich waschen. Messen Sie Hände und Kleidung auf eine eventuelle Kontamination, bevor Sie den ausgewiesenen Bereich verlassen. Materialien menschlichen Ursprungs, die bei der Herstellung des Kits verwendet wurden, wurden getestet und als nicht reaktiv auf HIV1- und 2- und HCV-Antikörper und HBsAg deklariert, sollten aber dennoch als potenziell infektiös behandelt werden. Waschen Sie sich gründlich die Hände, wenn eine Kontamination aufgetreten ist und bevor Sie das Labor verlassen. Sterilisieren Sie alle potenziell kontaminierten Abfälle, einschließlich Testproben, vor der Entsorgung. Die bei der Herstellung des Kits verwendeten Materialien tierischen Ursprungs stammen von Tieren, die als gesund zertifiziert wurden, jedoch sollten diese Materialien als potenziell infektiös gehandhabt werden. Einige Komponenten enthalten geringe Mengen Natriumazid als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie bei allen Kit-Komponenten das Verschlucken, Einatmen, Injizieren oder den Kontakt mit Haut, Augen oder Kleidung. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abflusssystem, indem Sie alle Komponenten des Kits mit reichlich Wasser wegsputzen.

ASSAY PLAN

Alle Reagenzien, mit Ausnahme des Assay Buffer, und Proben vor Gebrauch für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C) stehen lassen.	
Pipettieren:	20 µL Calibrators, Controls und Patientenseren
Pipettieren:	25 µL ¹²⁵ I-Labelled Insulin in alle Röhrchen (plus zwei zusätzliche leere Röhrchen für Totalaktivität)
Röhrchen:	Auf dem Vortexmischer mischen und abdecken
Inkubieren:	Über Nacht (16 – 24 Stunden) bei 20–25°C
Pipettieren:	100 µL Anti-Human-IgG (außer Totalaktivität)
Röhrchen:	Auf dem Vortexmischer mischen und abdecken
Inkubieren:	1 Stunde bei 2–8°C
Pipettieren:	2 mL kalter Assay Buffer (2–8°C) (außer Totalaktivität)
Röhrchen:	Auf dem Vortexmischer mischen und bei 1500 x g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugieren
Röhrchen:	Überstand absaugen oder dekantieren
Pipettieren:	2 mL kalter Assay Buffer (2–8°C) (außer Totalaktivität)
Röhrchen:	Auf dem Vortexmischer mischen und bei 1500 x g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugieren
Röhrchen:	Überstand absaugen oder dekantieren
Bei jedem Röhrchen 1 Minute lang die cpm mit einem Gammazähler bestimmen	