



IAA RIA

KIPM2035

History

Summary of change :

Previous Version :	Current Version :																																																																																
200224/1	200909																																																																																
<p>XI. CALCULATION OF RESULTS</p> <p>The calibrator curve is established by plotting the mean cpm-values of the calibrators 1 - 4 on the ordinate, y-axis, (lin. scale) versus their respective IAA-concentrations on the abscissa, x-axis, (log. scale).</p> <p>The IAA-concentrations of the controls and the unknown samples are directly read off in U/ml against the respective cpm values.</p> <p>The respective binding rates B related to the total radioactivity T may be used as well for setting up the standard curve (B/T %).</p> <p>The DIAsource IAA kit may be used also with Computer Assisted Analysis using software able to plot lin/log or log/log curves with spline smoothing, such as for sandwich-type assays (IRMA).</p> <p>Lin/log as well as log/log processing is possible!</p>	<p>XI. CALCULATION OF RESULTS</p> <p>The calibrator curve is established by plotting the mean cpm-values of the calibrators 1 - 4 on the ordinate, y-axis, (lin. or log. scale) versus their respective IAA-concentrations on the abscissa, x-axis, (log. scale). Negative control serum 0 should be assigned a value of 0.04 U/ml to assist in computer processing of assay results.</p> <p>The IAA-concentrations of the controls and the unknown samples are directly read off in U/ml against the respective cpm values.</p> <p>The respective binding rates B related to the total radioactivity T may be used as well for setting up the standard curve (B/T %).</p> <p>Lin/log as well as log/log processing is possible!</p>																																																																																
<p>XII. TYPICAL DATA</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Test tubes</th> <th>cpm (a)</th> <th>cpm (b)</th> <th>cpm (mean)</th> <th>B/T %</th> <th>U/ml</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Total radioactivity T</td> <td>25320</td> <td>25420</td> <td>25370</td> <td>100 %</td> <td>---</td> </tr> <tr> <td>Neg. Control 0</td> <td>328</td> <td>340</td> <td>334</td> <td>1.32</td> <td>0.04</td> </tr> <tr> <td>Calibrator 1</td> <td>654</td> <td>634</td> <td>644</td> <td>2.54</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>Calibrator 2</td> <td>924</td> <td>882</td> <td>903</td> <td>3.56</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Calibrator 3</td> <td>2830</td> <td>2352</td> <td>2591</td> <td>10.21</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Calibrator 4</td> <td>11007</td> <td>11737</td> <td>11372</td> <td>44.82</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>Patient 1</td> <td>5613</td> <td>5789</td> <td>5701</td> <td>22.5</td> <td>18.4</td> </tr> </tbody> </table>	Test tubes	cpm (a)	cpm (b)	cpm (mean)	B/T %	U/ml	Total radioactivity T	25320	25420	25370	100 %	---	Neg. Control 0	328	340	334	1.32	0.04	Calibrator 1	654	634	644	2.54	0.4	Calibrator 2	924	882	903	3.56	1	Calibrator 3	2830	2352	2591	10.21	10	Calibrator 4	11007	11737	11372	44.82	50	Patient 1	5613	5789	5701	22.5	18.4	<p>XII. TYPICAL DATA</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Test tubes</th> <th>cpm (mean)</th> <th>B/T %</th> <th>U/ml</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Total radioactivity T</td> <td>25370</td> <td>100</td> <td>---</td> </tr> <tr> <td>Neg. Control 0</td> <td>298</td> <td>1.3</td> <td>0.04</td> </tr> <tr> <td>Calibrator 1</td> <td>525</td> <td>2.3</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>Calibrator 2</td> <td>994</td> <td>4.4</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Calibrator 3</td> <td>2447</td> <td>10.9</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Calibrator 4</td> <td>11026</td> <td>49.3</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>Patient 1</td> <td>5701</td> <td>22.5</td> <td>18.4</td> </tr> </tbody> </table>	Test tubes	cpm (mean)	B/T %	U/ml	Total radioactivity T	25370	100	---	Neg. Control 0	298	1.3	0.04	Calibrator 1	525	2.3	0.4	Calibrator 2	994	4.4	2	Calibrator 3	2447	10.9	10	Calibrator 4	11026	49.3	50	Patient 1	5701	22.5	18.4
Test tubes	cpm (a)	cpm (b)	cpm (mean)	B/T %	U/ml																																																																												
Total radioactivity T	25320	25420	25370	100 %	---																																																																												
Neg. Control 0	328	340	334	1.32	0.04																																																																												
Calibrator 1	654	634	644	2.54	0.4																																																																												
Calibrator 2	924	882	903	3.56	1																																																																												
Calibrator 3	2830	2352	2591	10.21	10																																																																												
Calibrator 4	11007	11737	11372	44.82	50																																																																												
Patient 1	5613	5789	5701	22.5	18.4																																																																												
Test tubes	cpm (mean)	B/T %	U/ml																																																																														
Total radioactivity T	25370	100	---																																																																														
Neg. Control 0	298	1.3	0.04																																																																														
Calibrator 1	525	2.3	0.4																																																																														
Calibrator 2	994	4.4	2																																																																														
Calibrator 3	2447	10.9	10																																																																														
Calibrator 4	11026	49.3	50																																																																														
Patient 1	5701	22.5	18.4																																																																														
<p>Typical standard curve:</p>	<p>Typical standard curve:</p>																																																																																

Read entire protocol before use.

IAA RIA

I. INTENDED USE

Radioligand assay for the determination of Autoantibodies to Insulin (IAA) in human serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource IAA RIA Kit
- B. **Catalog number :** KIPM2035: 100 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

Type 1 diabetes, also known as insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), results from a chronic autoimmune destruction of the insulin-secreting pancreatic beta cells, probably initiated by exposure of genetically susceptible host to an environmental agent. Autoimmune destruction of beta cells is thought to be completely asymptomatic until 80-90% of the cells are lost. This process may take years to complete and may occur at any time in all ages.

The presence of Insulin autoantibodies (IAA) in patients never treated with insulin, as opposed to insulin antibodies (IAb), is evidence of ongoing destruction process of pancreatic beta cells in type 1 diabetes. IAA are particularly important when determining type 1 diabetes risk since their prevalence is significantly elevated in subjects developing the disease in childhood and moreover, they are often the first autoantibodies to be detected before onset of the disease. The prevalence of IAA is inversely correlated with the age of diagnosis.

In type 1 diabetics with recent onset of the disease in the age < 5 years IAA can be determined in > 90 % of the patients, whereas in type 1 diabetics in the age > 20 years the prevalence of IAA is < 20 %.

As concluded by the Fourth International Workshop for Insulin Autoantibody (IAA) Standardization (1992), liquid-phase assays such as radio-binding assay - RIA is the method of choice - detect IAA of higher predictive value for type 1 diabetes as ELISA.

The IAA measurement, together with that of antibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD65 Ab), protein tyrosine phosphatase-like antigen IA2 forms the basis of current strategies for predicting future onset of type 1 diabetes.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIASource IAA kit is a direct assay based on the principle of radioligand assays for the measurement of IgG-specific IAA.

Highly purified human ¹²⁵I-(A14) mono-iodinated insulin is used in the DIASource IAA kit. This tracer meets the highest requirements with regard to purity, fast reaction kinetics, cross reactivity at zero level and stability. These are the main prerequisites for the specific binding of the tracer and its exclusive recognition by the IAA of the sample in the first incubation step. This is followed in a second incubation step by addition of Protein A to precipitate any labeled insulin-anti insulin complexes which have formed. After removing the supernatant which contains the non-bound tracer by aspiration or decantation, the radioactivity of the remaining precipitate is measured.

The concentration of Insulin autoantibodies (IAA) in the sample is reflected by the specifically bound tracer amount. The radioactive signal (cpm) of the bound fraction (B) is proportional to the autoantibody concentration. No immune complex is formed if IAA are absent in the sample. The IAA value of the patient's sample is directly read off against this curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests Kit	Reconstitution
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">Ag</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">125I</div> TRACER: ¹²⁵ Iodine labelled Insulin (human, recombinant)	2 vials 1.5ml <0.034 MBq	Ready for use
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CAL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">N</div> Calibrators - N = 1 to 4 in human serum (conc: see vial label)	4 vials 0.5ml	Ready for use
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">PROTEIN A</div> Protein A compound	2 vials Lyo	Reconstitute with 2.6ml Reconstitution buffer
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">REC</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">SOLN</div> Reconstitution buffer	1 vial 6 ml	Ready for use
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">N</div> Controls - N = 1 or 2 in human serum (conc: see vial label)	2 vials 0.5ml	Ready for use
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">PREC</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">AGENT</div> Precipitation buffer	1 vial 105ml	Ready for use
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">SERUM</div> Negative control serum	1 vial 0.5ml	Ready for use

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

- Precision pipettes 50 µl, 100 µl, 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Graduated cylinders
- Conical tubes
- Distilled or de-ionized water
- Absorbent paper or paper towel
- Orbital shaker (> 250 rpm)
- γ-counter

VII. REAGENT PREPARATION

Allow samples to reach room temperature prior to assay. Take care to agitate serum samples gently in order to ensure homogeneity.

Tracer:

1.5 ml per vial, ready for use.

Reconstitution buffer:

The reconstitution buffer is ready for use and serves for the reconstitution of the protein A compound .

Protein A compound:

The protein A compound is lyophilized and, each has to be reconstituted with 2.6 ml of Reconstitution buffer.

Precipitation buffer:

The Precipitation buffer is ready for use and serves for the precipitation and washing step (7.).

Negative control serum:

0.5 ml, ready for use. Negative control serum can be used also as so-called **zero-calibrator**.

Negative control serum should be assigned a value of 0.04 U/ml to assist in computer processing of assay results.

Calibrators:

0.5 ml per vial, ready for use. Concentration:

Control sera:

0.5 ml per vial, ready for use. Concentration:

The standards and controls may be kept at 2 - 8 °C for up to 1 months, for long-term storage -20 °C is recommended.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

The DIASource IAA kit has been designed for 100 determinations. This is sufficient for the analysis of 41 unknown samples as well as for calibrators and control sera, assayed in duplicates.

The expiry date of each component is reported on its respective label, that of the complete kit on the box label.

Upon receipt, all components of the DIASource IAA kit have to be kept at 2 - 8 °C, preferably in the original kit box.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Specimen collection and storage

Blood is taken by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation. Plasma, Lipaemic and hemolytic samples should not be employed.

The samples may be kept at 2 - 8 °C up to three days. Long-term storage requires - 20 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided. For multiple use, initially aliquot samples and keep at - 20 °C.

X. PROCEDURE

Use conical tubes for the DIASource IAA kit only.

1. Label test tubes appropriately.
2. Pipette into the corresponding tubes according to assay scheme
 - 20 µl calibrators,
 - 20 µl negative control serum,
 - 20 µl control sera 1 and 2,
 - 20 µl patient's samples 1, 2, ...
3. Pipette 25 µl ready-to-use tracer into **all tubes**, including those for total radioactivity **T**.
Tubes T are now separated until radioactivity is measured.
4. Incubate overnight (at least 18 hours) at room temperature (20 - 25 °C).
5. Pipette 50 µl of the reconstituted protein A compound into each tube. (Agitate the suspension gently prior to use - please cf. section Reagent Preparation before use).
6. Vortex mix and incubate for **1 hour** at 4 - 8 °C.
7. Pipette in each tube **1 ml of cold (2 - 8 °C) precipitation buffer**.
8. Mix the tubes by vortexing and centrifuge the tubes for 30 minutes at a minimum of 2000 x g at 4 °C.
9. Aspirate supernatant completely or decant. For removal of any remaining liquid, turn tubes upside down (5 - 10 minutes) and absorb any droplets by gently tapping on blotting paper.
10. Measure radioactivity of **all tubes including T**. Recommended counting time: 1 minute

XI. CALCULATION OF RESULTS

The calibrator curve is established by plotting the mean cpm-values of the calibrators 1 - 4 on the ordinate, y-axis, (lin. or log. scale) versus their respective IAA-concentrations on the abscissa, x-axis, (log. scale). Negative control serum 0 should be assigned a value of 0.04 U/ml to assist in computer processing of assay results.

The IAA-concentrations of the controls and the unknown samples are **directly read off** in U/ml against the respective cpm values.

The respective binding rates B related to the total radioactivity T may be used as well for setting up the standard curve (B/T %).

Lin/log as well as log/log processing is possible!

XII. TYPICAL DATA

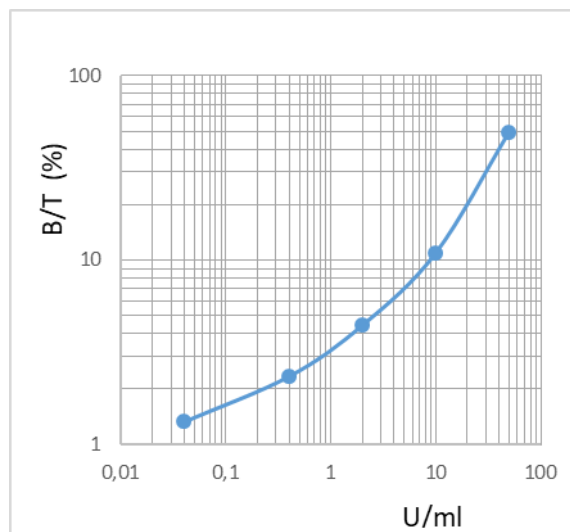
Do not use for evaluation!

Test tubes	cpm (mean)	B/T %	U/ml
Total radioactivity T	25370	100	---
Neg. Control 0	298	1.3	0.04
Calibrator 1	525	2.3	0.4
Calibrator 2	994	4.4	2
Calibrator 3	2447	10.9	10
Calibrator 4	11026	49.3	50
Patient 1	5701	22.5	24.1

Calculation of patient sample 1:

$$\frac{B}{T} (\%) = \frac{5701}{25370} \times 100 = 22.5 \%$$

Typical standard curve:



XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Analytical assay sensitivity is measured as 15 fold repetition of the negative control serum + 3 SD. It is determined to be 0.12 U/ml.

The most appropriate and statistically reasonable definition of the lower detection limit of any assay is at present the so-called **functional assay sensitivity**.

This functional assay sensitivity generally represents that concentration which corresponds to the 20 % (between assay) coefficient of variation in the respective precision profiles of the assay in the lower concentration range. Upon correct and thorough performance of the DIAsource IAA RIA kit this value is found at approx. 0.2 U/ml.

IAA values below this defined level of functional assay sensitivity do not meet the statistical criteria for reliability according to GLP (Good Laboratory

Practice) and therefore cannot be distinguished from zero due to the statistically necessary certainty.

IAA concentrations above approx. 0.2 U/ml, however, fulfill these criteria and are consequently assessed as valid.

Intra-assay			Inter-assay		
Sample no	Mean concentration (U/ml)	CV (%)	Sample no	Mean concentration (U/ml)	CV (%)
1	0.8	12	6	0.75	10
2	1.5	8.6	7	1	11
3	3.5	7.7	8	2.9	9
4	8.6	3.5	9	8.4	7
5	24.5	1.3	10	25.3	4

B. Specificity

The high quality of the tracer (¹²⁵I iodinated Insulin) does secure in direct assay principle of the test, that only IAA react and that any detectable cross reactions with autoantibodies to IA2, GAD65, Thyroglobulin, thyroidal Peroxidase, to the TSH receptor and Acetylcholine receptor should not exist.

C. Calibration

The units in the DIAsource IAA kit are arbitrary units.

D. Parallelism of standards and serum samples

Dilutions of specimen in IAA free human serum are determined according to their expected theoretical values with the DIAsource IAA kit.

In some cases the expected theoretical values are not determined due to the heterogeneous nature of the autoantibody population in human serum and in view of epitope specificity and affinity of the autoantibodies.

E. Limitations

Healthy individuals should be tested negative by using the DIAsource IAA kit.

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic method alone. Physicians are supposed to consider all clinical and laboratory findings possible to state a diagnosis.

XIV. REFERENCE INTERVALS

IAA	
IAA negative	< 0.4 U/ml
IAA positive	≥ 0.4 U/ml

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges for serum anti-IAA antibodies levels as usually done for other diagnostic parameters, too. Therefore, the above mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

XV. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 59 days), emitting ionizing X (27 -31 keV) and γ (35 keV) radiations.

This kit is for in vitro use only. Follow the working instructions carefully. This instruction manual is valid only for the present kit with the given composition. An exchange of single components is not in agreement with CE regulations.

The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. The same relates to the stability stated for reconstituted reagents.

All reagents should be kept at 2 - 8 °C before use in the original shipping container.

Some of the reagents contain small amounts (< 0.1 %) of sodium azide as a preservative. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucosa. The possible formation of heavy metal azides in the drainage has to be prevented by sufficient rinsing with water.

Source materials derived from human body fluids or organs used in the preparation of this kit were tested and found negative for both Hepatitis and HIV antibody. However, no known test guarantees the absence of such viral agents. Therefore, handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

Since the kit contains radioactive material the following precautions should be observed:

- Do not smoke, eat or drink while handling radioactive material in any room designated for working with radioactive material,
- Always use protective gloves,
- Never pipette radioactive material by mouth,
- Wipe up spills promptly, washing the affected surface thoroughly with a decontaminant,
- Place contaminated tissues, tubes, bench covers, gloves etc. in a specially marked container, discard liquid and solid radioactive waste only as permitted by federal, state or local authorities and regulations.

It is the responsibility of the user of this product to handle radioactive material in accordance to the national rules given by law or other statements of the local authorities.

In any case GLP with all general and individual regulation has to be applied to the use of this kit.

XVI. BIBLIOGRAPHY

- Hirata Y, H Ishizu, N Ouchi, S Motomura, M Abe, Y Hara, H Wakasugi, I Takahashi, H Sakano, M Tanaka, H Kawao & T Kanesaki: Insulin autoimmunity in a case with spontaneous hypoglycemia; Japan J Diabet 1970, 13: 312-319
- Palmer JP, CM Asplin, P Clemens, K Lyen, O Tatpati, PK Raghu & TL Paquette: Insulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment; Science 1983, 222:1337-1339
- Palmer JP, CM Asplin, PK Raghu, P Clemens, K Lyen, O Tatpati, B McKnight, TL Paquette, M Sperling, L Baker & R Guthrie: Anti-insulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment - a new marker for autoimmune beta cell damage?; Pediatr Adolesc Endocrinol 1986, 15:111-116
- Greenbaum CJ, CP Palmer, B Kuglin & H Kolb: Insulin autoantibodies measured by radioimmunoassay methodology are more related to insulin-dependent diabetes mellitus than those measured by enzyme-linked immunosorbent assay: results of the Fourth International Workshop on the Standardisation of Insulin Autoantibody Measurement; J clin Endocrinol Metab 1992; 74:1040-1044
- Williams AJK, PJ Bingley, E Bonifacio, JP Palmer & Eam Gale: A novel Micro-assay for Insulin Autoantibodies; J Autoimmunity 1997; 10:473-478
- Lindberg B, SA Ivarsson, M Landin-Olsson, G Sundkvist, L Svanberg & A Lernmark: Islet autoantibodies in cord blood from Children who developed Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus before 15 years of age; Diabetologia 1999; 42:181-187
- Potter KN & T J Wilkins: The molecular specificity of insulin autoantibodies; Diabetes Metab Res Rev 2000; 16:338-353

XVII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

1	Label test tubes*	Serum	Cal	Ctrls	Pat. sera	T
2	Pipette Negative control Calibrators Control sera Patient's sera 1, 2 etc.	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	
3	Pipette Tracer (ready-to-use)	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
4	Incubate**	overnight (at least 18 hours) at room temperature (20 - 25 °C)				
5	Pipette Reconstituted Protein A compound	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	
6	Incubate**	1 hour 4 - 8 °C				
7	Pipette Precipitation buffer cold (2 - 8 °C)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	
8	Centrifuge	Mix the tubes by vortexing and centrifuge at 2000 x g for 30 minutes at 4 - 8 °C				
9	Decant supernatant Or Aspirate supernatant	leave tubes upside down on absorbent paper for 5 - 10 minutes or quantitatively				
10	Count radioactivity	Counting time: 1 minute				

* Use conical tubes

** Prior to incubation, agitate the tubes briefly in order to ensure homogeneous reaction conditions.

DIAsource Catalogue Nr : KIPM2035	Revision nr : 200909
--------------------------------------	-------------------------

Revision date : 2020-09-09

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Leer todo el protocolo antes de utilizar.

IAA RIA

I. USO PREVISTO

Ensayo de radioligandos para la determinación de Autoanticuerpos contra la Insulina (IAA) en suero humano.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre registrado:** DIAsource IAA RIA Kit
- B. Número de catálogo:** KIPM2035: 100 determinaciones
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para obtener asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INDICACION DE USO

La diabetes tipo 1, también denominada diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), se produce a consecuencia de una destrucción autoinmune crónica de las células beta pancreáticas que segregan la insulina, probablemente iniciada por la exposición a un agente medioambiental de un huésped genéticamente susceptible. Se cree que la destrucción autoinmune de las células beta es totalmente asintomática hasta haberse perdido un 80-90 % de las células. Este proceso puede durar varios años y puede producirse en cualquier momento y a cualquier edad.

La presencia de autoanticuerpos contra la insulina (IAA) en pacientes no tratados nunca con insulina, a diferencia de los anticuerpos contra la insulina (IAb), es la prueba de que está teniendo lugar el proceso de destrucción de las células beta pancreáticas en la diabetes de tipo 1. Los IAA son especialmente importantes a la hora de determinar el riesgo de diabetes tipo 1 ya que su prevalencia es significativamente elevada en sujetos que desarrollan la enfermedad en la infancia, y es más, con frecuencia son los primeros autoanticuerpos que se detectan antes del comienzo de la enfermedad. Existe una correlación inversa entre la prevalencia de IAA y la edad del diagnóstico.

En los diabéticos tipo 1 con una aparición reciente de la enfermedad a una edad < 5 años se pueden determinar IAA en más del 90 % de los pacientes, mientras que en los diabéticos tipo 1 con una edad > 20 años la prevalencia de IAA es < 20 %.

Conforme se concluyó en el IV Taller Internacional para la Estandarización de Autoanticuerpos contra la Insulina (IAA)(1992), los ensayos en fase líquida como el ensayo de unión a radioligandos - RIA es el método de elección - detectan IAA de un valor diagnóstico mayor para la diabetes tipo 1 que ELISA.

La medición de IAA, junto con la de anticuerpos contra el ácido glutámico descarboxilasa (GAD₆₅ Ab) y el antígeno IA2 similar a la proteína tirosina fosfatasa, constituye la base de las estrategias actuales para predecir el desarrollo futuro de la diabetes tipo 1.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

DIAsource IAA es un ensayo directo que se basa en el principio de los ensayos de radioligandos para la medición de IAA IgG específicos.

En DIAsource IAA se utiliza la insulina monoyodada humana muy purificada 125-I-(A14). Este trazador cumple los requisitos más altos con respecto a pureza, cinética de rápida reacción, reactividad cruzada a nivel cero y estabilidad. Estos son los requisitos principales para la unión específica del trazador y su reconocimiento exclusivo por los IAA de la muestra en el primer paso de incubación. A esto le sigue un segundo paso de incubación mediante la adición de la proteína A para precipitar los complejos marcados con insulina-antiinsulina que se han formado. Después de retirar por aspiración o decantación el sobrenadante que contiene el trazador no unido, se mide la radiactividad del precipitado restante.

La concentración de autoanticuerpos contra la insulina (IAA) de la muestra se refleja por la cantidad de trazador unido específicamente. La señal radiactiva (cpm) de la fracción unida (B) es proporcional a la concentración de autoanticuerpos. No se forma ningún complejo inmune si la muestra carece de IAA. El valor de IAA de la muestra del paciente se lee directamente comparando con esta curva.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reagents	100 Tests Kit	Reconstitution		
<table border="1"> <tr> <td>Ag</td> <td>125I</td> </tr> </table> <p>Trazador: Insulina 125-I, humana, recombinante</p>	Ag	125I	2 vials 1.5ml <0.034 MBq	listos para usar
Ag	125I			
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Calibradores - N = 1 to 4 suero humano conc.: véase prospecto adju</p>	CAL	N	4 vials 0.5ml	listos para usar
CAL	N			
<table border="1"> <tr> <td>PROTEIN A</td> </tr> </table> <p>Compuesto proteína A</p>	PROTEIN A	2 vials Lyo	reconstitución: 2,6 ml tampón de reconstitución	
PROTEIN A				
<table border="1"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> <p>Tampón de reconstitución</p>	REC	SOLN	1 vial 6 ml	listos para usar
REC	SOLN			
<table border="1"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Controles - N = 1 or 2 suero humano conc.: véase prospecto adju</p>	CONTROL	N	2 vials 0.5ml	listos para usar
CONTROL	N			
<table border="1"> <tr> <td>PREC</td> <td>AGENT</td> </tr> </table> <p>Tampón de precipitación</p>	PREC	AGENT	1 vial 105ml	listos para usar
PREC	AGENT			
<table border="1"> <tr> <td>SERUM</td> </tr> </table> <p>Suero control negativo</p>	SERUM	1 vial 0.5ml	listos para usar	
SERUM				

VI. MATERIALES NO SUMINISTRADOS

- Pipetas de precisión 50 - 100 µl, 1000 µl
- Puntas desechables
- Cilindros graduados
- Agua destilada o desionizada
- Papel o toallas absorbentes
- Agitador orbital (> 250 rpm)
- Contador gamma
- Tubos cónicos

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Dejar que las muestras alcancen la temperatura ambiente antes de analizar. Cerciorarse de agitar las muestras de suero suavemente para garantizar la homogeneidad.

Trazador:

1,5 ml por vial, listo para usar.

Tampón de reconstitución:

El Tampón de reconstitución está listo para usar y sirve para la reconstitución del compuesto de la proteína A.

Componente con Proteína A:

La Componente con Proteína A está liofilizada y cada vial debe reconstituirse con 2,6 ml de Tampón de reconstitución.

Tampón de precipitación:

El Tampón de reconstitución está listo para usar y sirve para la precipitación y paso de lavado.

Suero control negativo:

0,5 ml, listo para usar. El suero control negativo se puede usar también como el denominado **calibrador cero**.

Al suero control negativo debe asignarse un valor de 0,04 U/ml para ayudar en el procesamiento informático de los resultados del ensayo.

Calibradores:

0,5 ml por vial, listos para usar.

Concentración: véase prospecto adjunto.

Controles:

0,5 ml por vial, listos para usar.

Concentración: véase prospecto adjunto.

Los patrones y controles pueden conservarse a 2 - 8 °C durante un máximo de 1 mes; para la conservación a largo plazo se recomiendan - 20 °C.

VIII. ALMACENAJE Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

DIAsource IAA se ha diseñado para realizar 100 determinaciones. Esto es suficiente para el análisis de 41 muestras desconocidas así como para los calibradores y sueros control analizados por duplicado.

La fecha de caducidad de cada componente se indica en su etiqueta correspondiente, la del kit completo en la etiqueta de la caja.

A su recepción, todos los componentes de DIAsource IAA deben conservarse a 2 - 8 °C, preferiblemente en la caja original del kit.

IX. TOMA DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN

Recogida y conservación de las muestras

La sangre se obtiene mediante venopunción. Tras su coagulación se separa el suero mediante centrifugación. No deben emplearse muestras plasmáticas, lipémicas ni hemolíticas.

Las muestras pueden conservarse a 2 - 8 °C un máximo de tres días. Para la conservación a largo plazo hacen falta - 20 °C.

Se debe evitar congelar y descongelar repetidamente. Para múltiples usos, formar partes alícuotas de las muestras inicialmente y conservar a - 20 °C.

X. PROCEDIMIENTO

Usar tubos cónicos para DIAsource IAA solamente.

1. Etiquete los tubos de ensayo adecuadamente.
2. Pipetee en los tubos correspondientes de acuerdo con el plan del ensayo:
 - 20 µl calibradores,
 - 20 µl suero control negativo,
 - 20 µl sueros control I y II,
 - 20 µl muestras del paciente 1, 2, ...
3. Pipetee 25 µl de trazador listo para usar en todos los tubos, incluidos aquellos para radiactividad total T.

Los tubos T se separan ahora hasta medir la radiactividad.
4. Incube durante la noche (al menos 18 horas) a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
5. Pipetee 50 µl del compuesto de la proteína A reconstituida (preparada a partir de Componente con Proteína A y Tampón de reconstitución) dentro de cada tubo.

(Agite la suspensión suavemente antes de usar - véase el apartado Preparación antes de usar en Componentes de la prueba).

6. Mezcle en el vórtex e incube durante 1 hora a 4 - 8 °C.
7. Pipetee en cada tubo 1 ml de tampón Tampón de precipitación frío (2 - 8 °C).
8. Mezcle los tubos en el vórtex y centrifúgelos durante 30 minutos a un mínimo de 2000 x g a 4 °C.
9. Aspire el sobrenadante por completo o decántelo. Voltee los tubos (5 - 10 minutos) para eliminar el resto de líquido y absorba las gotas dando golpecitos suaves en papel secante.
10. Mida la radiactividad de todos los tubos incluidos los T. Tiempo de medición recomendado: 1 minuto.

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

La curva del calibrador se establece representando los valores de cpm medios de los calibradores 1 - 4 en las ordenadas, eje de la Y, (escala lineal o logarítmica) en función de sus concentraciones de IAA respectivas en las abscisas, eje de la X, (escala logarítmica).

Las concentraciones de IAA de los controles y de las muestras desconocidas se **leen directamente** en U/ml comparándolas con los valores de cpm respectivos.

Las respectivas tasas de unión B relacionadas con la radiactividad total T pueden usarse también para establecer la curva estándar (B / T%).

¡Es posible tanto el procesamiento lin/log así como el log/log!

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

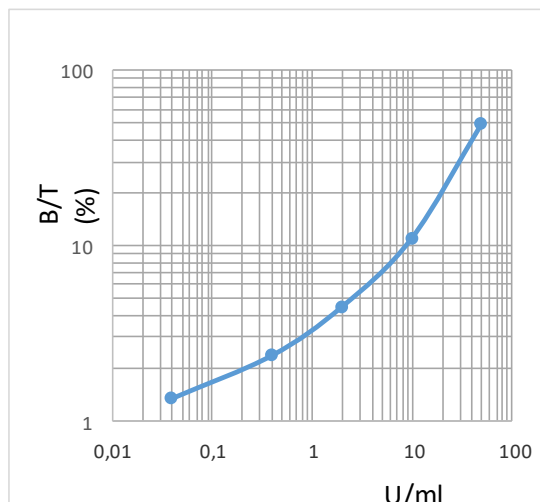
¡No usar para evaluación!

Tubos de ensayo	cpm (media)	$\frac{B}{T}$ %	U/ml
Radiactividad total T	25370	100	---
Control neg. 0	298	1.3	0.04
Calibrador 1	525	2.3	0.4
Calibrador 2	994	4.4	2
Calibrador 3	2447	10.9	10
Calibrador 4	11026	49.3	50
Paciente 1	5701	22.5	24.1

Cálculo de la muestra del paciente 1:

$$\frac{B}{T} (\%) = \frac{5701}{25370} \times 100 = 22.5 \%$$

Ejemplo típico:



XIII. RENDIMIENTO Y LIMITACIONES

A. Límite de la detección

La sensibilidad analítica del ensayo se mide mediante la repetición 15 veces del suero control negativo + 3 la DE. Se ha determinado que es de 0,12 U/ml.

La definición más apropiada y estadísticamente razonable del límite inferior de detección de un ensayo es actualmente la denominada sensibilidad funcional del ensayo.

Dicha sensibilidad funcional del ensayo representa generalmente la concentración que corresponde al coeficiente de variación del 20 % (interensayo) en los perfiles de precisión correspondientes del ensayo en el intervalo de concentración inferior. Tras un rendimiento correcto y exhaustivo de DIASource IAA este valor se encuentra en 0,2 U/ml aproximadamente.

Los valores de IAA por debajo de este nivel definido de sensibilidad funcional del ensayo no satisfacen los criterios estadísticos de fiabilidad de conformidad con las Buenas Prácticas de Laboratorio y, por tanto, no se pueden distinguir del cero debido a la certeza que es estadísticamente necesaria.

Sin embargo, unas concentraciones de IAA por encima de 0,2 U/ml aproximadamente, satisfacen estos criterios y se evalúan por consiguiente como válidas.

Intraensayo			Interensayo		
N.º de muestra	Concentración media (U/ml)	CV (%)	N.º de muestra	Concentración media (U/ml)	CV (%)
1	0,8	12	6	0,75	10
2	1,5	8,6	7	1	11
3	3,5	7,7	8	2,9	9
4	8,6	3,5	9	8,4	7
5	24,5	1,3	10	25,3	4

B. Especificidad

La alta calidad del trazador (insulina 125-I yodada) asegura en el principio de la prueba de ensayo directo, que solo los IAA reaccionan y que cualquier reacción cruzada detectable con autoanticuerpos contra IA2, GAD65, tiroglobulina, peroxidasa tiroidea, contra el receptor de TSH y el receptor de acetilcolina no debería de existir.

C. Calibración

Las unidades de DIASource IAA son arbitrarias.

D. Paralelismo entre los estándares y las muestras

Las diluciones de muestra en suero humano libre de IAA se determinan de acuerdo con sus valores teóricos esperados con DIASource IAA.

En base a la naturaleza heterogénea de la población de autoanticuerpos en suero humano y en vista de la especificidad de los epítopos y la afinidad de los autoanticuerpos, en los mismos casos no se determinan los valores teóricos esperados.

E. Limitaciones

Los individuos sanos deberían dar negativo al utilizar DIASource IAA.

El diagnóstico clínico no debe basarse en los resultados de un método diagnóstico in vitro únicamente. Los médicos han de considerar todos los datos clínicos y analíticos posibles para establecer un diagnóstico.

XIV. INTERVALOS DE REFERENCIA

IAA	
Negativo para IAA	< 0.4 U/ml
Positivo para IAA	≥ 0.4 U/ml

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia normales y patológicos de los niveles séricos de anticuerpos anti-IAA

como se hace habitualmente para otros parámetros de diagnóstico también. Por tanto, los valores de referencia arriba indicados solo sirven de guía de los valores que se podría esperar.

XV. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

$t_{1/2}$ = 59 días, radiación X,
(27 keV) and radiación gamma (35 keV)

* Este kit es solo para uso in vitro. Seguir las instrucciones de trabajo atentamente. Este manual de instrucciones es válido solamente para este kit con la composición dada. Conforme a la normativa de la CE no se deben intercambiar componentes individuales.

* Deben observarse las fechas de caducidad indicadas en las etiquetas correspondientes. Lo mismo es aplicable a la estabilidad indicada de los reactivos reconstituidos.

* Todos los reactivos deben conservarse a 2 - 8 °C antes de usar en el envase de transporte original.

* Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades (< 0,1 %) de azida sódica como conservante. No deben tragarse ni permitir que entren en contacto con la piel o las mucosas. Debe prevenirse la posible formación de azidas de metales pesados en los desagües aclarando con agua suficiente.

* Los materiales de base procedentes de fluidos u órganos de origen humano utilizados en la preparación de este kit fueron analizados y resultaron ser negativos para anticuerpos tanto de la hepatitis como del VIH. Sin embargo, ningún análisis conocido garantiza la ausencia de dichos agentes víricos. Por tanto, todos los componentes y todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran potencialmente peligrosas.

* Como el kit contiene material radiactivo, deben observarse las siguientes precauciones:

- No fumar, comer ni beber mientras se manipule el material radiactivo en ninguna sala designada para trabajar con dicho material,
- Usar siempre guantes protectores,
- No pipetear nunca material radiactivo con la boca,
- Limpiar los derrames rápidamente, lavando la superficie afectada a fondo con un descontaminante,
- Poner los tejidos, tubos, cubiertas de la superficie de trabajo, guantes, etc. contaminados en un contenedor marcado especialmente, desechar los residuos líquidos y sólidos radiactivos únicamente conforme esté permitido por las autoridades y la normativa local, autonómica o nacional.

* Es responsabilidad del usuario de este producto manipular el material radiactivo de conformidad con las disposiciones nacionales proporcionadas a través de la legislación u otros comunicados de las autoridades locales.

* En cualquier caso deben aplicarse Buenas Prácticas de Laboratorio con toda la normativa general e individual a la hora de usar este kit.

XVI. BIBLIOGRAFIA

- Hirata Y, H Ishizu, N Ouchi, S Motomura, M Abe, Y Hara, H Wakasugi, I Takahashi, H Sakano, M Tanaka, H Kawao & T Kanesaki: Insulin autoimmunity in a case with spontaneous hypoglycemia; Japan J Diabet 1970, 13: 312-319
- Palmer JP, CM Asplin, P Clemens, K Lyen, O Tatpati, PK Raghu & TL Paquette: Insulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment; Science 1983, 222:1337-1339
- Palmer JP, CM Asplin, PK Raghu, P Clemens, K Lyen, O Tatpati, B McKnight, TL Paquette, M Sperling, L Baker & R Guthrie: Anti-insulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment - a new marker for autoimmune beta cell damage?; Pediatr Adolesc Endocrinol 1986, 15:111-116
- Greenbaum CJ, CP Palmer, B Kuglin & H Kolb: Insulin autoantibodies measured by radioimmunoassay methodology are more related to insulin-dependent diabetes mellitus than those measured by enzyme-linked immunosorbent assay: results of the Fourth International Workshop on the Standardisation of Insulin Autoantibody Measurement; J clin Endocrinol Metab 1992; 74:1040-1044
- Williams AJK, PJ Bingley, E Bonifacio, JP Palmer & Eam Gale: A novel Micro-assay for Insulin Autoantibodies; J Autoimmunity 1997; 10:473-478

- Lindberg B, SA Ivarsson, M Landin-Olsson, G Sundkvist, L Svanberg & A Lernmark: Islet autoantibodies in cord blood from Children who developed Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus before 15 years of age; Diabetologia 1999; 42:181-187
- Potter KN & T J Wilkins: The molecular specificity of insulin autoantibodies; Diabetes Metab Res Rev 2000; 16:338-353

XVII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

1	Etiquetar tubos de ensayo	Serum	Cal	Ctrls	Sueros paciente 1, 2, etc.	T
2	Pipetear Control negativo (CAL 0) Calibradores Sueros control Sueros paciente 1, 2, etc.	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	
3	Pipetear trazador (listo para usar)	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
4	Incubar*	durante la noche (al menos 18 horas) a temperatura ambiente (20 - 25 °C)				
5	Pipetear Compuesto proteína A (preparado a partir de Compuesto proteína A y Tampón de reconstitución)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	
6	Incubar*	1 hora 4 - 8 °C				
7	Pipetear Tampón de precipitación frío (2 - 8 °C)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	
8	Centrifugar	Mezclar los tubos con el vórtex y centrifugar a 2000 x g durante 30 minutos a 4 - 8 °C				
9	Decantar el sobrenadante o Aspirar el sobrenadante	voltrear los tubos sobre papel absorbente durante 5 - 10 minutos o cuantitativamente				
10	Medir la radiactividad	Tiempo de medición: 1 minuto				

* Antes de la incubación, agitar los tubos brevemente para garantizar unas condiciones homogéneas de reacción.

DIAsource Catalogue Nr : KIPM2035	Revision nr : 200909
--------------------------------------	-------------------------