



DCM083-5  
Ed. 01/2015

# IAA

per analisi di routine

**Test ELISA quantitativo per la determinazione di autoanticorpi circolanti anti Insulina umana nativa nel siero umano**

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO083

## DESTINAZIONE D'USO

Il kit IAA è un test immunoenzimatico per la determinazione quantitativa degli autoanticorpi circolanti di tipo IgG specifici contro l'Insulina umana. Il kit IAA è destinato al solo uso di laboratorio.

## 1. SIGNIFICATO CLINICO

Il diabete di tipo 1, anche conosciuto come mellito insulino-dipendente (IDDM), è caratterizzato dalla distruzione autoimmune cronica delle cellule-beta pancreatiche secernenti insulina. Questa patogenesi è dovuta probabilmente all'esposizione di soggetti geneticamente suscettibili ad agenti ambientali. Si pensa che la distruzione autoimmune delle cellule-beta pancreatiche sia completamente asintomatica fino alla perdita dell'80-90% delle cellule. Questo processo può iniziare a qualsiasi età e può durare anni per essere completato. La presenza degli autoanticorpi anti insulina (IAA) nei pazienti mai trattati con Insulina, al contrario agli anticorpi Insulina (IAb), è prova del processo di distruzione delle cellule beta pancreatiche nel diabete dei tipo 1. IAA sono particolarmente importanti quando si determina il rischio di tipo 1 dal momento che la loro prevalenza è significativamente alta nei soggetti che sviluppano la malattia nell'infanzia e inoltre sono spesso i primi autoanticorpi a essere rilevati prima dell'inizio della malattia. La prevalenza degli IAA è inversamente correlata con l'età della diagnosi. Nei diabetici di tipo 1 con inizio recente della malattia ad un'età inferiore a 5 anni, gli IAA possono essere determinati in oltre il 90 % dei pazienti, mentre nei diabetici di tipo 1 con età inferiore a 20 anni la prevalenza degli IAA è maggiore del 20 %. La misura degli IAA, insieme con quella degli anticorpi contro glutamic acid decarboxylase (Ac GAD65), dell'antigene proteina tyrosine phosphatase-(IA2) e degli antigeni delle cellule delle isole pancreatiche (ICA) forma la base della strategia corrente per la predizione dello sviluppo futuro del diabete di tipo 1. Oltre gli autoanticorpi contro l'Insulina umana, possono essere spesso trovati gli anticorpi indotti per il trattamento con l'Insulina. Questi anticorpi sono presenti ad una concentrazione molto più alta e sono principalmente diretti contro le frazioni denaturate (diversa conformazione) dell'Insulina utilizzata. Questo comporta la formazione di complessi antigene-anticorpo e la conseguente riduzione dell'attività della

Insulina iniettata. Per una gestione ottimale della malattia quando si usa Insulina è necessario sottoporre i pazienti ai test.

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

Nella prima fase, gli anticorpi anti Insulina del campione diluito si fissano all'Insulina adsorbita sulle micropiastre. Dopo un'incubazione di 60 minuti a temperatura ambiente (22-28°C) i componenti non fissati sono eliminati per lavaggio. Gli anticorpi fissati reagiscono con gli anticorpi anti IgG umane coniugati a perossidasi di rafano (HRP) aggiunti nella seconda fase. Dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C), il coniugato in eccesso è eliminato tramite un altro lavaggio. Infine l'HRP che rimane legata alla piastra converte il colore del Substrato TMB da incolore a blu. Dopo 15 minuti a temperatura ambiente (22-28°C) la reazione enzimatica è bloccata per aggiunta della Stop Solution. L'assorbanza del prodotto giallo ottenuto è misurato a 450 nm; la densità ottica ottenuta è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi fissati. La concentrazione di anticorpi anti Insulina nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

## 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

#### 1. Calibrators (5 flaconi, 1 mL ciascuno)

|      |                   |
|------|-------------------|
| CAL1 | REF DCE002/8307-0 |
| CAL2 | REF DCE002/8308-0 |
| CAL3 | REF DCE002/8309-0 |
| CAL4 | REF DCE002/8310-0 |
| CAL5 | REF DCE002/8311-0 |

#### 2. Controls (2 flaconi, 1 mL ciascuno)

|                  |                   |
|------------------|-------------------|
| Negative Control | REF DCE045/8301-0 |
| Positive Control | REF DCE045/8302-0 |

#### 3. Conjugate (1 flacone, 15 mL)

Anticorpi anti IgG umane coniugati a perossidasi di rafano (HRP) REF DCE002/8302-0

#### 4. Sample diluent (1 flacone, 100 mL)

Tampone fosfato REF DCE053/8353-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)  
Insulina ricombinante umana adsorbita su micropiastra  
**REF DCE002/8303-0**
6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)  
**REF DCE004/8304-0**
7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)  
Acido solforico 0.25M (evitare il contatto con la pelle)  
**REF DCE005/8305-0**
8. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 100 mL)  
Tampone fosfato  
**REF DCE054/8354-0**

### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata o deionizzata.

### 3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

## 4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300<sup>R</sup> come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

## 5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando

specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.

- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
  - Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
  - Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
  - **ATTENZIONE: il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni**; si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; **questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso.**
- A tale scopo Diametra rende disponibile separatamente un reagente decontaminante per il lavaggio degli aghi.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
  - Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
  - Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
  - L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
  - Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
  - Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.

- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o bemozzati
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

## 6. PROCEDIMENTO

### 6.1. Preparazione dei Calibratori (C<sub>1</sub>...C<sub>5</sub>)

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

|      | C <sub>1</sub> | C <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> | C <sub>5</sub> |
|------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| U/mL | 0.1            | 1              | 5              | 10             | 20             |

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Dopo l'apertura dei flaconi sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

### 6.2. Preparazione del Coniugato

La soluzione di anticorpi anti IgG umane coniugati a perossidasi di rafano (HRP) (Conjugate, reattivo 3) è pronta all'uso.

Dopo l'apertura è stabile fino a 4 settimane a 2-8°C.

### 6.3. Preparazione della Wash Solution

Preparare una quantità sufficiente di wash solution diluendo la 10X Conc. Wash Solution 1:10 con acqua distillata o deionizzata. Per esempio, diluire 50 mL della soluzione concentrata con 450 mL di acqua distillata. La soluzione non deve presentare cristalli prima della diluizione; eventualmente dissolvere i cristalli scaldando al max a 37°C. La soluzione diluita può essere conservata a 2-8°C fino a 30 giorni.

### 6.4. Preparazione del campione

Il sangue è prelevato da vena periferica. Dopo coagulazione, il siero è separato per centrifugazione. Non usare campioni lipemici o emolizzati. **Il plasma non deve essere usato.** I campioni possono essere conservati a 2-8°C fino a 3 giorni. Per periodi a lungo termine conservare a -20°C. Evitare congelamento e scongelamento ripetuti.

**I campioni devono essere diluiti 1:101 con Sample diluent** (esempio: 5 µL campione + 500 µL sample diluent).

### 6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.**
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C per un massimo di 30 giorni.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

| Reagente                                   | Calibratore | Campione /Controlli | Bianco |
|--|-------------|---------------------|--------|
| Campione diluito                           |             | 100 µL              |        |
| Calibratore C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub> | 100 µL      |                     |        |
| Controlli                                  |             | 100 µL              |        |

Coprire la piastra e incubare per 1 ora a temperatura ambiente (22-28°C).

Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita.

**Nota importante:** ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra invertita su fogli di carta assorbente.

Un lavaggio insufficiente provoca una bassa precisione e Densità Ottiche falsamente elevate.

|           |        |        |  |
|-----------|--------|--------|--|
| Coniugato | 100 µL | 100 µL |  |
|-----------|--------|--------|--|

Coprire la piastra e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C).

Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita.

**Nota importante:** ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra invertita su fogli di carta assorbente.

Un lavaggio insufficiente provoca una bassa precisione e densità ottiche falsamente elevate.

|               |        |        |        |
|---------------|--------|--------|--------|
| TMB Substrato | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
|---------------|--------|--------|--------|

Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22-28°C) al buio.

|               |        |        |        |
|---------------|--------|--------|--------|
| Stop Solution | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
|---------------|--------|--------|--------|

Agitare delicatamente la micropiastra.

Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.

## 7. RISULTATI

### 7.1. Curva di calibrazione

Tracciare le medie delle repliche dei valori di OD dei calibratori 1 - 5 sulle ordinate, y-axis, contro le loro rispettive concentrazioni IAA-Ab sulle ascisse, x-axis. Tracciare la curva che meglio approssima i punti ottenuti. Calcolare le concentrazioni degli IAA-Ab dei controlli e dei campioni diluiti per estrapolazione diretta delle concentrazioni in U/mL associate ai valori di OD misurate a 450 nm sulla retta tracciata. Non sono necessarie altre correzioni per le diluizioni.

Il kit IAA può anche essere usato mediante analisi assistita da computer con software capace di usare spline smoothing fitting.

Esempio:

| Campione      | DO (a)<br>450 nm | DO (b)<br>450 nm | DO<br>(media) | U/mL |
|---------------|------------------|------------------|---------------|------|
| Calibratore 1 | 0.082            | 0.073            | 0.078         | 0.1  |
| Calibratore 2 | 0.288            | 0.226            | 0.257         | 1    |
| Calibratore 3 | 0.824            | 0.720            | 0.772         | 5    |
| Calibratore 4 | 1.804            | 1.700            | 1.752         | 10   |
| Calibratore 5 | 2.697            | 2.607            | 2.652         | 20   |
| Neg. Control  | 0.150            | 0.160            | 0.155         | 1.2  |
| Pos. Control  | 1.360            | 1.323            | 1.342         | 8.0  |
| Patient 1     | 0.540            | 0.530            | 0.535         | 3.0  |

#### Criteria di validazione:

Campioni con una OD più alta rispetto al Calibratore 5 devono essere diluiti con il sample diluent e la concentrazione degli anticorpi IAA / IA deve essere calcolata applicando il fattore di diluizione.

#### 7.2. Valori di riferimento

|          | IAA (U/mL) |
|----------|------------|
| Negativo | < 2.4      |
| Positivo | ≥ 2.4      |

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

### 8. CARATTERISTICHE DEL METODO

#### 8.1. Calibrazione

Il kit IAA è artificialmente calibrato e le concentrazioni di IAA sono espresse in U/mL.

#### 8.2. Specificità e Sensibilità

I risultati disponibili mostrano una sensibilità diagnostica del 77% e una specificità diagnostica del 94% (valutata su 100 sieri di soggetti sani). I valori relativi per la sensibilità e la specificità si riferiscono ai risultati ottenuti con il Golden Standard IAA RIA. Non sono conosciute altre possibilità per la misura degli anticorpi Insulina per l'uso in routine.

#### 8.3. Limite di rilevazione

La sensibilità analitica (limite di rilevazione più basso, bianco + 3 SD) è di 0,1 U/mL.

Il limite di quantificazione (LOQ, bianco + 10 SD) è 0.3 U/mL.

### 8.4. Variazione Intra and inter-assay

| Intra-assay (n=20) |                    |        | Inter-assay (n=5x10) |                    |        |
|--------------------|--------------------|--------|----------------------|--------------------|--------|
| Camp n°            | Conc. Media (U/mL) | CV (%) | Camp n°              | Conc. Media (U/mL) | CV (%) |
| 1                  | 4.8                | 7.5    | 4                    | 5.3                | 5.4    |
| 2                  | 9.1                | 2.3    | 5                    | 9.5                | 2.4    |
| 3                  | 18.4               | 4.0    | 6                    | 18.5               | 1.2    |

### 9. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

### BIBLIOGRAFIA

- Hirata Y, H Ishizu, N Ouchi, S Motomura, M Abe, Y Hara,
- H Wakasugi, I Takahashi, H Sakano, M Tanaka, H Kawaao & 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: Antiinsulin antibodies in Insulin-dependent diabetes before Insulin treatment - a new marker for autoimmune beta cell damage?; Pediatr Adolesc Endocrinol 1986, 15:111-116
- Ziegler, AG, R Ziegler, P Vardi, RA Jackson, JS Soeldner & GS Eisenbarth: Life-table Analysis of Progression to Diabetes od Anti-Insulin Autoantibody-positive Relatives of Individuals with Type 1 Diabetes; Diabetes 1989, 38:1320-1325
- 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

Ed. 01/2015

DCM083-5

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Calabria 15,  
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM083-5  
Ed. 01/2015

## IAA

**Quantitative ELISA test for the detection of circulating autoantibodies against human native Insulin in human serum**

for routine analysis

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO083

### INTENDED USE

IAA kit is an enzymatic immunoassay for the quantitative determination of circulating IgG autoantibodies specific to human Insulin.

IAA kit is intended for laboratory use only.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

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 an evidence of an 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 younger than 5 years IAA can be determined on over 90 % of the patients, whereas in type 1 diabetics over 20 years the prevalence of IAA is greater than 20 %.

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

In addition to autoantibodies to human Insulin, antibodies induced by Insulin treatment can be frequently found. Such antibodies occur at much higher concentration and are mainly directed against denatured (incorrectly folded) fraction of applied Insulin. This may lead to formation of antigen-antibody-complexes and by this reducing of the activity of the injected Insulin. Measurements are necessary to obtain an optimal disease management when applying Insulin.

### 2. PRINCIPLE

In the first step the antibodies anti Insulin from the diluted sample bind to human recombinant Insulin coated on the microtiter plate. After an incubation of 60 minutes at room temperature (22-28°C), the unbound components are removed by a washing step. In the next step the bound antibodies react with the added anti human IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP). After 30 minutes at room temperature (22-28°C) the excess of conjugate is removed by another washing step. Then the HRP converts the added colourless TMB Substrate into a blue product. After 15 minutes at room temperature (22-28°C) the enzymatic reaction is stopped by adding the Stop Solution. The absorbance of the resulting yellow product is measured at 450 nm; the obtained optical density is direct proportional to the amount of bound antibodies.

The concentration of antibodies anti Insulin is calculated through a calibration curve.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagent and material supplied in the kit

##### 1. Calibrators (5 vials, 1 mL each)

|      |                   |
|------|-------------------|
| CAL1 | REF DCE002/8307-0 |
| CAL2 | REF DCE002/8308-0 |
| CAL3 | REF DCE002/8309-0 |
| CAL4 | REF DCE002/8310-0 |
| CAL5 | REF DCE002/8311-0 |

##### 2. Controls (2 vials, 1 mL each)

|                  |                   |
|------------------|-------------------|
| Negative Control | REF DCE045/8301-0 |
| Positive Control | REF DCE045/8302-0 |

##### 3. Conjugate (1 vial, 15 mL)

Anti human IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/8302-0

##### 4. Sample diluent (1 vial, 100 mL)

Phosphate buffer

REF DCE053/8353-0

##### 5. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Human recombinant insulin coated on the microplate

REF DCE002/8303-0

##### 6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)

REF DCE004/8304-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)  
0.25M sulfuric acid (*avoid any skin contact*)  
REF DCE005/8305-0
8. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 100 mL)  
Phosphate buffer REF DCE054/8354-0

### 3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled or deionized water.

### 3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

## 4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts Proclin 300<sup>R</sup> as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

## 5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.

- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.** For this purpose, Diametra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 6. PROCEDURE

### 6.1. Preparation of Calibrators (C<sub>1</sub>...C<sub>5</sub>)

The Calibrators are ready for use and have the following concentration:

|      | C <sub>1</sub> | C <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> | C <sub>5</sub> |
|------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| U/mL | 0.1            | 1              | 5              | 10             | 20             |

The Calibrators are stable until the expiry date printed on the label. Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.



### 6.2. Preparation of the Conjugate

The anti human IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Conjugate, reactive 3) are ready to use. Once opened the solution is stable up to 4 weeks at 2-8°C.

### 6.3. Preparation of the Wash Solution

Prepare a sufficient amount of washing solution by diluting the 10X Conc. Wash Solution 1:10 with distilled or deionized water. For example, dilute 50 mL of the concentrate Wash Solution with 450 mL of distilled water. The solution should be free of crystals before dilution, otherwise dissolve by warming up to max 37°C. The diluted washing solution can be stored at 2-8°C up to 30 days.

### 6.4. Preparation of the Sample

Blood is taken by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation. Do not use lipaemic or grossly haemolysed serum samples. **Plasma should not be used.** 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, aliquot samples and keep them at - 20 °C. **Patients samples have to be diluted 1:101 with sample diluent** (e.g. 5 µL sample + 500 µL sample diluents)

### 6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.**
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C at maximum 30 days.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

| Reagent  | Calibrator | Sample/<br>Controls | Blank |
|--|------------|---------------------|-------|
| Diluted sample   |            | 100 µL              |       |
| Calibrator C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub>  | 100 µL     |                     |       |
| Controls   |            | 100 µL              |       |
| Cover the plate. Incubate at room temperature (22-28°C) for 1 hour.<br>Remove the contents from each well and wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution.<br><b>Important note:</b> during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.<br>An insufficient washing will result to poor precision and falsely elevated absorbances. |            |                     |       |

| Conjugate  | 100 µL | 100 µL |        |
|--|--------|--------|--------|
| Cover the plate. Incubate at room temperature (22-28°C) for 30 minutes.<br>Remove the contents from each well and wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution.<br><b>Important note:</b> during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.<br>An insufficient washing will result to poor precision and falsely elevated absorbances. |        |        |        |
| TMB Substrate  | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Incubate 15 minutes at room temperature (22-28°C) in the dark  |        |        |        |
| Stop Solution  | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Shake the microplate gently.<br>Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.  |        |        |        |

## 7. RESULTS

### 7.1. Calibration curve

The calibration curve is established by plotting the mean OD-values of the calibrators 1 - 5 on the ordinate, y-axis, versus their respective IAA-Ab concentrations on the abscissa, x-axis. The IAA Abs concentrations of the controls and the unknown diluted samples are directly read off in U/mL from the measured OD<sub>450</sub> values. There is no further correction for the dilution necessary.

The IAA kit may be used also with Computer Assisted Analysis with software able to use spline smoothing fitting.

Example:

| Sample       | OD (a)<br>450 nm | OD (b)<br>450 nm | OD<br>(mean) | U/mL |
|--------------|------------------|------------------|--------------|------|
| Calibrator 1 | 0.082            | 0.073            | 0.078        | 0.1  |
| Calibrator 2 | 0.288            | 0.226            | 0.257        | 1    |
| Calibrator 3 | 0.824            | 0.720            | 0.772        | 5    |
| Calibrator 4 | 1.804            | 1.700            | 1.752        | 10   |
| Calibrator 5 | 2.697            | 2.607            | 2.652        | 20   |
| Neg. Control | 0.150            | 0.160            | 0.155        | 1.2  |
| Pos. Control | 1.360            | 1.323            | 1.342        | 8.0  |
| Patient 1    | 0.540            | 0.530            | 0.535        | 3.0  |

### Criteria of validation:

Specimens with an OD higher than Calibrator 5 should be diluted further with the sample diluent and the concentration of IAA / IA antibodies should be calculated by applying the dilution factor.

## 7.2. Reference values

| IAA (U/mL) |       |
|------------|-------|
| Negative   | < 2.4 |
| Positive   | ≥ 2.4 |

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

## 8. CHARACTERISTICS

### 8.1. Calibration

The IAA kit is artificially calibrated and concentrations of IAA are therefore expressed in U/mL.

### 8.2. Specificity and Sensitivity

The results available show a diagnostic sensitivity of 77% and a diagnostic specificity of 94% (assayed on 100 sera from healthy subjects). Relative values for sensitivity and specificity refer to corresponding results obtained by the Golden Calibrator IAA RIA. No other possibilities to measure Insulin autoantibodies are known on a routine basis, yet.

### 8.3. Detection Limit

The analytical sensitivity (lower detection limit, blank + 3 SD) is 0.1 U/mL.

The quantification limit (LOQ, blank + 10 SD) is 0.3 U/mL.

### 8.4. Intra and inter-assay variation

| Intra-assay (n=20) |                   |        | Inter-assay (n=5x10) |                   |        |
|--------------------|-------------------|--------|----------------------|-------------------|--------|
| Sample n°          | Mean Conc. (U/mL) | CV (%) | Sample n°            | Mean Conc. (U/mL) | CV (%) |
| 1                  | 4.8               | 7.5    | 4                    | 5.3               | 5.4    |
| 2                  | 9.1               | 2.3    | 5                    | 9.5               | 2.4    |
| 3                  | 18.4              | 4.0    | 6                    | 18.5              | 1.2    |

## 9. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

---

## BIBLIOGRAPHY

1. Hirata Y, H Ishizu, N Ouchi, S Motomura, M Abe, Y Hara,
2. H Wakasugi, I Takahashi, H Sakano, M Tanaka, H Kawao & T Kanasaki: Insulin autoimmunity in a case with spontaneous hypoglycemia; Japan J Diabet 1970, 13: 312-319
3. 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
4. Palmer JP, CM Asplin, PK Raghu, P Clemens, K Lyen, O Tatpati, B McKnight, TL Paquette, M Sperling, L Baker & R Guthrie: AntiInsulin antibodies in Insulin-dependent diabetes before Insulin treatment - a new marker for autoimmune beta cell damage?; Pediatr Adolesc Endocrinol 1986, 15:111-116
5. Ziegler, AG, R Ziegler, P Vardi, RA Jackson, JS Soeldner & GS Eisenbarth: Life-table Analysis of Progression to Diabetes of Anti-Insulin Autoantibody-positive Relatives of Individuals with Type 1 Diabetes; Diabetes 1989, 38:1320-1325
6. Williams AJK, PJ Bingley, E Bonifacio, JP Palmer & Eam Gale: A novel Micro-assay for Insulin Autoantibodies; J Autoimmunity 1997; 10:473-478
7. 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
8. Potter KN & T J Wilkins: The molecular specificity of Insulin autoantibodies; Diabetes Metab Res Rev 2000; 16:338-353

Ed. 01/2015

DCM083-5

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Calabria 15,  
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com





DCM083-5  
Ed. 01/2015

## IAA

para análisis de rutina

**Ensayo ELISA cuantitativo para detección de autoanticuerpos circulantes contra insulina nativa en suero humano**

IVD



LOT

Vease etiqueta externa

2°C 8°C



$\Sigma = 96$  ensayos

REF DKO083

### USO PREVISTO

El kit IAA es un ensayo para la detección cuantitativa de autoanticuerpos de tipo IgG circulantes específicos contra la insulina humana.

El kit IAA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

### 1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La diabetes de tipo 1, o diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), está causada por la destrucción autoinmune crónica de las células pancreáticas beta productoras de insulina. Es probable que la enfermedad se desencadene como consecuencia de la exposición de individuos genéticamente predispuestos a factores ambientales. Se estima que la destrucción autoinmune de las células beta es completamente asintomática hasta que se pierde entre el 80 y el 90 % de dichas células. Este proceso puede comenzar a cualquier edad y en cualquier momento, y tardar años en completarse.

La presencia de autoanticuerpos anti-insulina (IAA) en pacientes que nunca recibieron tratamiento con insulina, por oposición a los anticuerpos insulina (AI), en la diabetes de tipo 1 denuncia un proceso en curso de destrucción de las células pancreáticas beta.

Los AAI son especialmente importantes a la hora de determinar el riesgo de diabetes de tipo 1, dado que se presentan en número significativamente alto en individuos que desarrollan la enfermedad en la infancia; es más, con frecuencia son los primeros autoanticuerpos que se detectan antes de que la enfermedad se manifieste. La preponderancia de AAI es inversamente proporcional a la edad en que se diagnostica la enfermedad.

Los AAI pueden detectarse en más del 90% de pacientes diabéticos de tipo 1 con menos de cinco años de edad en los cuales la enfermedad se ha manifestado recientemente; en los pacientes del mismo tipo de más de 20 años de edad, la preponderancia de AAI es inferior al 20%.

La medición de los AAI, junto con la de los anticuerpos contra la glutamato decarboxilasa (GAD65), del antígeno de la proteína tirosina fosfatasa (IA2) y de antígenos de las células de los islotes (ICA) están en la base de la estrategia actual para predecir la manifestación futura de diabetes de tipo 1.

Además de los autoanticuerpos contra insulina humana, con frecuencia pueden encontrarse anticuerpos inducidos por tratamiento con insulina. La concentración de estos anticuerpos es mucho más elevada y se dirigen principalmente contra la fracción desnaturalizada (de diferente conformación) de la

insulina suministrada. Esto puede llevar a la formación de complejos de antígeno-anticuerpo con la consiguiente disminución de la actividad de la insulina inyectada. En los pacientes tratados con insulina es necesario efectuar análisis con la finalidad de manejar la enfermedad de la mejor manera posible.

### 2. PRINCIPIO

En la primera fase, los anticuerpos anti insulina de la muestra diluida se ligan a la insulina fijada en las microplacas. Tras 60 minutos de incubación a temperatura ambiente (22-28°C), los componentes que no se han ligado se eliminan mediante lavado.

En la fase sucesiva, se provoca la reacción de los anticuerpos ligados añadiendo un conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP) y anti-IgG humana.

Después de incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C), se elimina el exceso de conjugado mediante un nuevo lavado. La HRP transforma el sustrato TMB que se añade en un producto azul. La reacción enzimática se detiene agregando una solución ácida después de 15 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). En los siguientes 30 minutos se mide la absorbancia del producto amarillo que resulta a 450 / 620 nm. La DO que se obtiene es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos ligados.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

#### 3.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (5 frascos, 1 mL cada uno)

|      |                   |
|------|-------------------|
| CAL1 | REF DCE002/8307-0 |
| CAL2 | REF DCE002/8308-0 |
| CAL3 | REF DCE002/8309-0 |
| CAL4 | REF DCE002/8310-0 |
| CAL5 | REF DCE002/8311-0 |

2. Controles (2 frasco, 1 mL cada uno)

|                  |                   |
|------------------|-------------------|
| Negative Control | REF DCE045/8301-0 |
| Positive Control | REF DCE045/8302-0 |

3. Conjugado (1 frasco, 15 mL)

|                               |                   |
|-------------------------------|-------------------|
| Conjugado anti-IgG humana-HRP | REF DCE002/8302-0 |
|-------------------------------|-------------------|

4. Diluyente de muestras (1 frasco, 100 mL)

|                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| Tampón de fosfato | REF DCE053/8353-0 |
|-------------------|-------------------|

5. Microplaca ricubierta (1 microplaca)

|                               |                   |
|-------------------------------|-------------------|
| Insulina fijada en microplaca | REF DCE002/8303-0 |
|-------------------------------|-------------------|

6. Solución sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -TMB (0,26 g/L) (*evítese el contacto con la piel*)  
**REF** DCE004/8304-0
7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)  
Ácido sulfúrico 0,25M (*evítese el contacto con la piel*)  
**REF** DCE005/8305-0
8. Solución de lavado conc 10X (1 frasco, 100 mL)  
Tampón fosfato **REF** DCE054/8354-0

### 3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada o desionizada.

### 3.3. Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

## 4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradores y de los controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y 2, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y lo control positivo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN<sub>3</sub>) o Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavado para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles

quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.

- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

## 5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- **ATENCIÓN: se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa adecuadamente, podría contaminarse por agentes externos;** se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad necesaria exacta de conjugando y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática,** se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la fluidica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteinización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; **este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso.** Para tal fin, Diametra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una

placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.

- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

## 6. PROCEDIMIENTO

### 6.1. Preparación de los Calibradores (C<sub>1</sub>...C<sub>5</sub>)

Los Calibradores son listos para usar y tienen las siguientes concentraciones:

|      | C <sub>1</sub> | C <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> | C <sub>5</sub> |
|------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| U/mL | 0.1            | 1              | 5              | 10             | 20             |

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

### 6.2. Preparación del conjugado

La solución anti IgG humana-HRP (Conjugado, reactivo 3) está listo para usar e permanece estable durante 4 semanas después de la apertura, conservada a 2-8°C.

### 6.3. Preparación de la solución de lavado

Preparar una cantidad suficiente de solución de lavado diluyendo el tampón concentrado en proporción de 1:10 con agua destilada o desionizada. Por ejemplo, diluir 50 mL de solución concentrada en 450 mL de agua destilada. Antes de la dilución, la solución no debe presentar cristales; si fuera necesario, disolverlos calentando el producto hasta un máximo de 37°C. La solución diluida se conserva hasta 30 días a 2-8°C.

### 6.4. Preparación de la muestra

La sangre se extrae por venopunción. Una vez coagulada, se centrifuga para separar el suero. No utilizar muestras lipémicas o muy hemolizadas. **No se debe utilizar plasma.**

Las muestras se conservan hasta 3 días a 2 - 8 °C. Para una conservación prolongada, el suero se congelará a -20°C. Evítese congelar y descongelar repetidamente las muestras.

**Las muestras se diluyen en proporción 1:101 con el diluyente de muestras.** Ejemplo: 5 µL de muestra + 500 µL de diluyente para muestras.

### 6.5. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.**
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C para un máximo de 30 días.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

| Reactivo   | Calibradores | Muestras /Control | Blanco |
|--|--------------|-------------------|--------|
| Muestra diluida  |              | 100 µL            |        |
| Calibradores C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub>  | 100 µL       |                   |        |
| Control  |              | 100 µL            |        |
| Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (22-28°C) durante 1 hora.<br>Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida.<br><b>Nota importante:</b> agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.<br>Un lavado insuficiente da como resultado una escasa precisión y DO falsamente altas.     |              |                   |        |
| Conjugado  | 100 µL       | 100 µL            |        |
| Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (22-28°C) durante 30 minutos.<br>Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida.<br><b>Nota importante:</b> agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.<br>Un lavado insuficiente da como resultado una escasa precisión y DO falsamente altas. |              |                   |        |
| Substrato TMB  | 100 µL       | 100 µL            | 100 µL |
| Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22-28°C), protegida de la luz.  |              |                   |        |
| Solución de parada   | 100 µL       | 100 µL            | 100 µL |
| Agitar suavemente la placa.<br>Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.  |              |                   |        |

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Curva de calibración

La Curva de calibración se determina indicando la media de los valores de DO de los Calibradores 1-5 en el eje y de ordenadas, contra sus respectivas concentraciones de autoanticuerpos IAA en el eje x de abscisas.

Además se debe utilizar el control negativo (CI) (ver abajo).

La concentración de autoanticuerpos IAA de los controles y las muestras desconocidas se calcula directamente en IU/mL a partir de los valores de DO medidos a 450 nm indicados en la Curva de calibración.

El kit anti-Insulin puede utilizarse también para análisis computarizados, con un software que utilice un mecanismo de alisado por splines.

Ejemplo:

| Muestra      | DO (a)<br>450 nm | DO (b)<br>450 nm | DO<br>(media) | U/mL |
|--------------|------------------|------------------|---------------|------|
| Calibrador 1 | 0,082            | 0,073            | 0,078         | 0,1  |
| Calibrador 2 | 0,288            | 0,226            | 0,257         | 1    |
| Calibrador 3 | 0,824            | 0,720            | 0,772         | 5    |
| Calibrador 4 | 1,804            | 1,700            | 1,752         | 10   |
| Calibrador 5 | 2,697            | 2,607            | 2,652         | 20   |
| Neg. Control | 0,150            | 0,160            | 0,155         | 1,2  |
| Pos. Control | 1,360            | 1,323            | 1,342         | 8,0  |
| Paciente 1   | 0,540            | 0,530            | 0,535         | 3,0  |

### Crterios de validación:

Las muestras con DO más alta respecto al Calibrador 5 se han de diluir con el diluyente específico; la concentración de anticuerpos IAA/IA se calcula aplicando el factor de dilución.

### 7.2. Valores de referencia

| IAA      |            |
|----------|------------|
| negativo | < 2.4 U/mL |
| positivo | ≥ 2.4 U/mL |

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

## 8. CARACTERÍSTICAS

### 8.1. Calibración

El kit IAA está calibrado artificialmente y las concentraciones se expresan en U/mL.

### 8.2. Especificidad y sensibilidad

Los resultados disponibles muestran una sensibilidad diagnóstica del 77% y una especificidad diagnóstica del 94% (evaluado en 100 sueros de sujetos sanos).

### 8.3. Límites de detección

La sensibilidad analítica (límite de detección o concentración mínima detectable, 0 +/- 3 SD) se establece en 0,1 U/mL.

El límite de cuantificación (LOQ, blanco + 10 SD) se establece en 0,3 U/mL.

### 8.4. Variación intra y entre ensayos

| Intra ensayo (n=20) |                    |        | Entre ensayos (n=5x10) |                    |        |
|---------------------|--------------------|--------|------------------------|--------------------|--------|
| Muestra n°          | Conc. Media (U/mL) | CV (%) | Muestra n°             | Conc. Media (U/mL) | CV (%) |
| 1                   | 4.8                | 7.5    | 4                      | 5.3                | 5.4    |
| 2                   | 9.1                | 2.3    | 5                      | 9.5                | 2.4    |
| 3                   | 18.4               | 4.0    | 6                      | 18.5               | 1.2    |

## 9. ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben desecharse de acuerdo con las normativas locales.

## BIBLIOGRAFÍA

- 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: Antinsulin antibodies in Insulin-dependent diabetes before Insulin treatment - a new marker for autoimmune beta cell damage?; Pediatr Adolesc Endocrinol 1986, 15:111-116
- Ziegler, AG, R Ziegler, P Vardi, RA Jackson, JS Soeldner & GS Eisenbarth: Life-table Analysis of Progression to Diabetes of Anti-Insulin Autoantibody-positive Relatives of Individuals with Type 1 Diabetes; Diabetes 1989, 38:1320-1325
- 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

Ed. 01/2015

DCM083-5

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Calabria 15,  
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39.02.2139184

Fax +39.02.2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39.0742.24851

Fax +39.0742.316197

E-mail: info@diametra.com

|  |                                  |   |  |                                  |  |
|--|----------------------------------|---|--|----------------------------------|--|
|                     | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | In vitro Diagnostikum<br>Producto sanitario para diagnóstico In vitro<br>Dispositif medical de diagnostic in vitro<br>In vitro Diagnostic Medical Device<br>Dispositivo medico-diagnostico in vitro<br>Dispositivos medicos de diagnostico in vitro   |             | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | Hergestellt von<br>Elaborado por<br>Fabriqué par<br>Manufacturer<br>Produttore<br>Produzido por                                    |
|                     | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | Achtung, Begleitdokumente<br>Precaución, consulte los documentos adjuntos<br>Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement<br>Caution, consult accompanying documents<br>Attenzione, consultare la documentazione allegata<br>Atenção, consultar os documentos de acompanhamento | <br>yyyy-mm | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | Herstellungs datum<br>Fecha de fabricacion<br>Date de fabrication<br>Date of manufacture<br>Data di produzione<br>Data de produção |
| <br>yyyy-mm-dd      | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | Verwendbar bis<br>Establa hasta (usar antes de último día del mes)<br>Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué)<br>Use by (last day of the month)<br>Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese)<br>Utilizar (antes ultimo dia do mês)  |            | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | Biogefährdung<br>Riesco biológico<br>Risque biologique<br>Biological risk<br>Rischio biologico<br>Risco biológico                  |
|                   | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | Gebrauchsanweisung beachten<br>Consultar las instrucciones<br>Consulter le mode d'emploi<br>Consult instructions for use<br>Consultare le istruzioni per l'uso<br>Consultar instruções para uso   | <b>LOT</b>   | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | Chargenbezeichnung<br>Codigo de lote<br>Numero de lot<br>Batch code<br>Codice del lotto<br>Codigo do lote                          |
| <br>$\Sigma = xx$ | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | Ausreichend für "n" Tests<br>Contenido suficiente para "n" tests<br>Contenu suffisant pour "n" tests<br>Contains sufficient for "n" tests<br>Contenuto sufficiente per "n" saggi<br>Contém o suficiente para "n" testes   | <b>CONT</b>  | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | Inhalt<br>Contenido del estuche<br>Contenu du coffret<br>Contents of kit<br>Contenuto del kit<br>Conteúdo do kit                   |
| <br>Max<br>Min    | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | Temperaturbereich<br>Límitación de temperatura<br>Limites de température de conservation<br>Temperature limitation<br>Limiti di temperatura<br>Temperaturas limites de conservação  | <b>REF</b>   | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | Bestellnummer<br>Número de catálogo<br>Références du catalogue<br>Catalogue number<br>Numero di Catalogo<br>Número do catálogo     |
|                   | DE<br>ES<br>FR<br>GB<br>IT<br>PT | Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen<br>Mantener alejado de la luz solar<br>Tenir à l'écart de la lumière du soleil<br>Keep away from sunlight<br>Tenere lontano dalla luce solare<br>Mantenha longe da luz solar   |  |                                  |  |



**SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING****ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

**Reazione troppo blanda (OD troppo basse)**

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

**Reazione troppo intensa (OD troppo alte)**

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

**Valori inspiegabilmente fuori scala**

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

**CV% intrasaggio elevato**

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

**CV% intersaggio elevato**

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

**ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS****No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

**Too low reaction (too low ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

**Too high reaction (too high ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

**Unexplainable outliers**

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation



**ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS****No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

**Reacción escasa (DO demasiado bajas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

**Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**Valores inexplicablemente fuera de escala**

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**CV% intraensayo elevado**

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

**CV% interensayo elevado**

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

**ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS****Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

**Réaction trop faible (DO trop basse)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

**Réaction trop intense (DO trop élevée)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**Valeurs inexplicablement hors plage**

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**CV% intra-essai élevé**

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

**CV% inter-essai élevé**

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs