Instructions for Use

IA2 Ab RIA

IVD

CE

REF **RIA-6047**

Σ **50**

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

(2023-03-03)

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
Por favor, usar a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1 INTENDED PURPOSE 2
2 DIAGNOSTIC RELEVANCE 2
3 TEST PRINCIPLE 2
4 TEST COMPONENTS 2
5 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED 3
6 STORAGE AND STABILITY 3
7 GENERAL INFORMATION 3
8 PREPARATION 3
9 TEST PERFORMANCE 4
10 TEST EVALUATION 4
11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 5
12 WARNINGS AND PRECAUTIONS 5
13 DISPOSAL 6

1 ZWECKBESTIMMUNG 7
2 DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG 7
3 TESTPRINZIP 7
4 TESTKOMPONENTEN 7
5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL 7
6 LAGERUNG UND HALTBARKEIT 8
7 ALLGEMEINE HINWEISE 8
8 VORBEREITUNG 8
9 DURCHFÜHRUNG 9
10 AUSWERTUNG 9
11 LEISTUNGSMERKMALE 10
12 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN 11
13 ENTSORGUNG 11

14 REFERENCES / LITERATUR 12

SYMBOLS USED 13

1 INTENDED PURPOSE

The IA2 Ab RIA is a quantitative immunoassay for the determination of antibodies against protein tyrosine phosphatase (IA_2) in human serum.
The IA2 Ab RIA is intended as an aid in the diagnosis of autoimmune diabetes mellitus type 1 in conjunction with other clinical and laboratory findings.
The immunoassay is designed for manual professional *in vitro* diagnostic use.

2 DIAGNOSTIC RELEVANCE

Diabetes mellitus type 1 is a chronic autoimmune disease in which the insulin producing beta cells of the islets of Langerhans in the pancreas are destroyed. The consequence of this destruction is a reduced insulin production, which results in high blood sugar levels as diabetes mellitus. Genetic predispositions and viral infections considered risk factors, but the exact causes have not yet been fully clarified.
The destruction of the insulin-producing beta cells of the pancreas is based on the presence of islet cell antibodies (ICA), which are directed against different antigens of the pancreatic islet cells, such as glutamic acid decarboxylase (GAD65), tyrosine phosphatase (insulinoma-associated antigen 2, IA2), the zinc transporter 8 (ZnT8) and against insulin. Islet cell antibodies (ICA) can be detected in 70 – 80 % of patients with diabetes mellitus. The different antibodies usually appear months to years before the occurrence of elevated blood sugar levels and are therefore also considered important prognostic markers to identify patients with an increased risk of developing diabetes mellitus type 1. The combined detection of antibodies against GAD65, IA2, ZnT8 and insulin is considered an important method for diagnosing diabetes mellitus type 1 at the onset of the disease.

Protein tyrosine phosphatase (insulinoma-associated antigen 2, IA2) is localized in the granules of pancreatic beta cells.

Antibodies against IA2 can be detected in the majority of patients with diabetes mellitus type 1 and in a large number of individuals in the Prediabetic phase. The appearance of antibodies against the protein tyrosine phosphatase IA2 is correlated with rapid progression.

3 TEST PRINCIPLE

Radioimmunoassays are widely used for the determination of specific antibodies. For this purpose, tracer molecules composed of antigens conjugated to radioactive components detect specific antibodies in the patient´s sample. Protein A binds antibodies from the sample and allows for the simple separation of agglutinated immune complexes from the reaction mixture by centrifugation. The radioactivity of the precipitate is measured and proportional to the antibody activity in the sample.

4 TEST COMPONENTS

Component 50 Determinations		Description
Calibrator **1 – 5** CAL	5 x 0.25 mL	Dilutions of human serum (ready-to-use; contain sodium azide) The antibody activities are indicated on the quality control certificate.
Low Control **CI** CONTROL	1 x 0.25 mL	Dilution of human serum (ready-to-use; contains sodium azide) The antibody activity is indicated on the quality control certificate.
High Control **CII** CONTROL	1 x 0.25 mL	Dilution of human serum (ready-to-use; contains sodium azide) The antibody activity is indicated on the quality control certificate.
Tracer **D** TRAC	1 lyophilizate	Human recombinant IA_2 conjugated to Iodine-125 (< 0.1 MBq, t½ = 59 days; gamma radiation 35 keV, x radiation 27 keV, 31 keV; lyophilized, contains sodium azide)
Reconstitution buffer **H** RBU	1 x 6 mL	Solution (ready-to-use; contains sodium azide)
Precipitation buffer **J** PBU	1 x 55 mL	Solution (ready-to-use; contains sodium azide)
Protein A **L** PA	1 lyophilizate	Suspension of protein A (lyophilized, contains sodium azide)
QC Certificate	1 piece	-
Instructions for Use	1 piece	-

5 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Common laboratory equipment
- Precision pipettes (5 – 1000 µL) and disposable tips
- Graduated cylinders (100 – 1000 mL)
- Conical sample tubes and racks
- Vortex mixer or other rotators
- Centrifuge
- γ-counter
- Adsorbent paper or paper towel
- Distilled or de-ionized water

6 STORAGE AND STABILITY

Upon receipt, all test components must be stored at 2 °C to 8 °C, preferably in the original kit box. If stored properly in their original containers, all components are stable until their expiry date.

7 GENERAL INFORMATION

This product is for *in vitro* diagnostic use only. The instructions for use must be carefully read before use. They are valid only for the present product with the given composition and must be strictly followed to ensure reliable test results. Deviations can lead to erroneous test results. Components must not be exchanged by test reagents of different lots or of other manufacturers.

Contamination of reagents must be avoided by use of aseptic techniques when removing aliquots from the vials. After use, reagent vials must be tightly closed with their corresponding caps.

Cross-contamination of samples or reagents can lead to inconsistent test results and must be avoided by use of consistent pipetting techniques.

8 PREPARATION

8.1 Preparation of Reagents

All components must be brought to room temperature (RT: 18 °C to 25 °C) before use for at least 30 min; expect the precipitation buffer which must be stored at 2 °C to 8 °C until use. All liquid components must be mixed gently to ensure homogeneity.

8.1.1 Calibrators

The calibrators are ready-to-use and must not be diluted any further.
Calibrators must be used in each test run.

8.1.2 Controls

The controls are ready-to-use and must not be diluted any further.
Controls must be used in each test run. Laboratories can also validate their own control samples and use them alternatively.

8.1.3 Reconstitution Buffer

The reconstitution buffer is ready-to-use and serves for reconstitution of tracer and protein A.

8.1.4 Tracer

The tracer is lyophilized and must be reconstituted with 2.6 mL reconstitution buffer per vial.
The reconstituted tracer remains stable for 2 weeks when stored at 2 °C to 8 °C.

8.1.5 Protein A

The protein A is lyophilized and must be reconstituted with 2.6 mL reconstitution buffer per vial.
The reconstituted protein A solution remains stable for 2 weeks when stored at 2 °C to 8 °C.

8.1.6 Precipitation Buffer

The precipitation buffer is ready-to-use and must be stored at 2 °C to 8 °C until use.

8.2 Preparation of Samples

8.2.1 Sample Material

The use of freshly collected **serum** from blood taken by venipuncture is recommended.

The use of icteric, lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples should be avoided. Insoluble substances must be removed from the sample by centrifugation. Samples must not be thermally inactivated.

8.2.2 Sample Storage

Samples may be kept at 2 °C to 8 °C up to three days.

Long-term storage requires -20 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided. For multiple use, samples should be aliquoted and kept at -20 °C.

9 TEST PERFORMANCE

9.1 Procedure

Conical sample tubes are recommended for processing the radioimmunoassay. A sufficient amount of tubes for calibrators, controls and samples must be prepared including an extra tube for analyzing the isolated tracer as a reference. The indicated incubation times and temperatures must be adhered to and significant time shifts during pipetting samples and reagents must be avoided.

Step	Description
1. Addition of calibrators, controls, and undiluted samples	Add 20 µL ready-to-use calibrators, controls, and undiluted samples per test tube. Prepare an additional test tube for isolated tracer material to determine total radioactivity T as a reference
2. Addition of tracer	Add 50 µL tracer material prepared from D and H per test tube including the additional test tube to determine total radioactivity T as a reference. Total radioactivity T reference tube should be set aside until analysis.
3. Incubation	Incubate the tubes **overnight (at least 18 hours) at 2 °C to 8 °C**.
4. Addition of Protein A	Add 50 µL of protein A solution prepared from L and H to each tube
5. Incubation	Incubate the tubes for **1 hour at 2 °C to 8 °C.**
6. Addition of precipitation buffer	Add 1 mL cold precipitation buffer to each tube and vortex
7. Centrifugation	Centrifuge the tubes for **30 min at 2 °C to 8 °C** with 2000 x g.
8. Decantation	Decant or aspirate the supernatant. For removal of any remaining liquid, turn tubes upside down (30 min) and absorb any droplets by tapping on blotting paper.
9. Analysis	Measure radioactivity of all tubes including T with a γ-counter and a recommended counting time of 1 minutes.

10 TEST EVALUATION

10.1 Metrological Traceability

The immunoassay is calibrated using an internal reference sample. Quantitative results are expressed in U/mL.

10.2 Quantitative Evaluation

For generation of a standard curve, the measured radioactivity (counts per minute; cpm) of the calibrators are plotted against their antibody activities and correlated by spline smoothing. Antibody activities of unknown samples can be derived directly from their measured radioactivity (counts per minute; cpm) by use of the generated standard curve.

As an alternative, the quantitative evaluation may be based on the initial calculation of binding rates B/T (%) by division of the measured radioactivity (counts per minute; cpm) of all calibrators, controls and patient samples with the total radioactivity T. For generation of a standard curve, the calculated binding rates B/T (%) of the calibrators are plotted against their antibody activities and correlated by spline smoothing. Antibody activities of unknown samples can be derived directly from their calculated binding rates B/T (%) by use of the generated standard curve.

10.3 Criteria of Validity

Test runs are only valid if the following criteria of validity are fulfilled:

- cpm or B/T (%) CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4 < CAL 5
- The controls must present an antibody activity within the validity range indicated on the quality control certificate.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

10.4 Troubleshooting

In case of an invalid test run, the expiry dates and storage conditions, incubation times and temperatures, and precise calibration of all instruments used should be verified. If no reason for an invalid test run could be identified, please contact the supplier or manufacturer of the product.

10.5 Reference Ranges

The reference ranges are indicated below:

	Interpretation
Antibody activity < 1 U/mL	negative
Antibody activity 1 - 2 U/mL	borderline
Antibody activity > 2 U/mL	positive

As a result of different seroprevalences in individual regions, each laboratory should verify the reference ranges by own analysis and adapt, if necessary.

10.6 Interpretation of Test Results

A positive test result indicates the presence of specific antibodies. A negative result indicates the absence of specific antibodies, but does not exclude the possibility of an autoimmune reaction. In case of a borderline test result, a reliable evaluation is not possible.

10.7 Limitations of the Method

The interpretation of test results must always be considered in combination with the clinical picture of the patient. The diagnosis should not be based on the results of a sole diagnostic method. All clinical and laboratory findings should be evaluated to state a diagnosis. For confirmation, further investigations should be carried out.

11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1 Analytical Performance Characteristics

11.1.1 Analytical Sensitivity and Specificity

The Limit of Quantitation (LoQ) was correlated to an intra-assay coefficient of variation of 10 % and an inter-assay coefficient of variation of 20 %.

	Analytical Sensitivity
Limit of Quantitation (LoQ)	0.8 U/mL

The high quality of the tracer ensures the exclusive reaction of anti- IA_2 autoantibodies in direct assay principle. Any detectable cross reaction with autoantibodies to GAD_{65}, Insulin, thyroglobulin, thyroidal peroxidase, to the TSH receptor and Acetylcholine receptor does not exist.

11.1.2 Precision

The precision of test results was assessed by the determination of the intra- and inter-assay variation by the analysis of multiple samples with different antibody activities.

	Intra-assay Precision		Inter-assay Precision	
	U/mL	CV (%)	U/mL	CV (%)
Sample 1	0.8	10.4	0.9	18.5
Sample 2	5.8	4.2	6.1	3.0
Sample 3	24.7	2.6	24.8	2.0

11.1.3 Measurement Range

Reliable accuracy, trueness, precision, linearity and recovery of test results have been observed within the measurement range of the assay from the LoQ to the upper calibrator in comprehensive studies. Samples with test results above the upper calibrator should be reported as >max. Samples with test results below the LoQ should be reported as <min. If test results above the upper calibrator are observed, the samples may be tested at a higher dilution. The resulting antibody activity must be multiplied with the additional dilution factor.

11.2 Diagnostic Performance Characteristics

11.2.1 Diagnostic Sensitivity and Specificity

The sensitivity and specificity were assessed by the analysis of 42 samples of diabetes type 1 patients and 41 samples of non-selected blood donors.

	Diagnostic Performance
Sensitivity	88 %
Specificity	95 %

12 WARNINGS AND PRECAUTIONS

The product is designed exclusively for *in vitro* diagnostic use by qualified, authorized and trained personnel. All test components and human samples should be handled with care as potentially hazardous. Good laboratory practices (GLP) and all relevant regulations should be adhered to.

In case the product is damaged or product information including labelling is wrong or incorrect, please contact the manufacturer or supplier.

This product contains preparations of human and / or animal origin. Any material derived from human body fluids or organs used for the preparation of components were tested and found negative for HBsAg (Hepatitis B-Virus-surface Antigen) and anti-HIV as well as anti-HCV antibodies. However, all components and all patient samples should be handled as potentially hazardous in accordance with national laws and appropriate guidelines on biological safety.

As the product contains potentially hazardous and / or radioactive materials, the following precautions should be followed: Do not smoke, eat or drink while handling kit material or samples. Avoid direct contact to kit material or samples by wearing protective gloves laboratory coat and safety glasses. Never pipette material by mouth. Wipe up spills promptly and wash the affected surface thoroughly with a decontaminant. Wash hands thoroughly after use.

Some of the reagents contain sodium azide (< 0.1 %) as a preservative and 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.

The information in the safety data sheet on possible hazards, first aid measures, measures in the event of the unintentional release of large quantities, handling and storage, personal protective equipment, information on disposal as well as information on toxicology must be observed.

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the member state in which the user and/or the patient is established.

13 DISPOSAL

For decontamination and disposal, the recommendations of the CDC as well as the relevant local and national environmental guidelines and regulations should be adhered to. Samples, potentially contaminated materials and infectious waste must be decontaminated, e.g., by autoclaving for 20 minutes at 121 °C.

Some of the reagents contain radioactive material. Contaminated tissues, tubes, bench covers, gloves etc. must be disposed 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.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der IA2 Ab RIA ist ein quantitativer Immunoassay zur Bestimmung von Antikörpern gegen die Protein Tyrosin Phosphatase (IA_2) in humanem Serum.

Der IA2 Ab RIA dient zur Unterstützung bei der Diagnose des autoimmunen Diabetes mellitus Typ 1 in Verbindung mit anderen klinischen und laboratoriumsmedizinischen Untersuchungen

Der Immunoassay ist für den manuellen professionellen in-vitro diagnostischen Gebrauch bestimmt.

2 DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG

Diabetes mellitus Typ-1- ist eine chronische Autoimmun-erkrankung, bei der die insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse, zerstört werden. Die Folge dieser Zerstörung ist eine verminderte Insulinproduktion, die sich schließlich als Diabetes mellitus mit hohen Blutzuckerspiegeln manifestiert. Als Risikofaktoren gelten genetische Prädispositionen sowie Virusinfektionen, allerdings sind die genauen Ursachen noch nicht völlig geklärt.

Die Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen der Bauchspeicheldrüse basiert auf der Bildung von Insel-zellantikörpern (ICA), die sich gegen unterschiedliche Antigene der pankreatischen Inselzellen richten, wie gegen die Glutaminsäuredecarboxylase (GAD65), die Proteintyrosin-phosphatase (Insulinoma-assoziiertes Antigen 2, IA2), den Zinktransporter 8 (ZnT8) sowie gegen Insulin.

Inselzellantikörper (ICA) können bei 70 – 80 % der Patienten mit Diabetes mellitus nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Antikörper treten in der Regel bereits Monate bis Jahre vor dem Auftreten erhöhter Blutzuckerwerte auf und gelten somit auch als wichtige prognostische Marker, um Patienten mit erhöhtem Risiko zu identifizieren, einen Diabetes mellitus Typ 1 zu entwickeln. Der kombinierte Nachweis von Antikörpern gegen GAD65, IA2, ZnT8 und Insulin gilt als wichtige Methode, einen Diabetes mellitus Typ 1 bereits bei Krankheitsbeginn zu diagnostizieren.

Die Proteintyrosinphosphatase (Insulinoma-assoziiertes Antigen 2, IA2) ist in den Granula der Betazellen der Bauchspeicheldrüse lokalisiert Antikörper gegen IA2 können bei der Mehrzahl der Patienten mit Diabetes mellitus sowie bereits bei einer Vielzahl von

Patienten in der prädiabetischen Phase nachgewiesen werden. Das Auftreten von Antikörpern gegen IA_2 wird mit einem schnellen Fortschritt des Diabetes mellitus Typ-1 korreliert

3 TESTPRINZIP

Radioimmunoassays werden häufig zur Bestimmung spezifischer Antikörper verwendet. Zu diesem Zweck detektieren Tracermoleküle bestehend aus einem Antigen und einer radioaktiven Komponente spezifische Antikörper in der Patientenprobe. Protein A binden die Antikörper aus der Probe und ermöglichen die einfache Trennung der gebildeten Immunkomplexe von der Reaktionsmischung durch Zentrifugation. Die Radioaktivität des Präzipitats wird gemessen und ist proportional zur Antikörperaktivität in der Probe.

4 TESTKOMPONENTEN

Komponente 50 Bestimmungen	Beschreibung
Kalibrator **1 – 5** CAL 5 x 0.25 mL	Verdünnungen von humanem Serum (gebrauchsfertig; enthalten Natriumazid) Die Antikörperaktivitäten sind auf dem Qualitätskontroll-zertifikat angegeben.
Niedrige Kontrolle **CI** CONTROL 1 x 0,25 mL	Verdünnung von humanem Serum (gebrauchsfertig; enthält Natriumazid) Die Antikörperaktivität ist auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben.
Hohe Kontrolle **CII** CONTROL 1 x 0,25 mL	Verdünnung von humanem Serum (gebrauchsfertig; enthält Natriumazid) Die Antikörperaktivität ist auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben.
Tracer **D** TRAC 1 Lyophilisat	Humane rekombinante IA_2 konjugiert mit Iod-125 (< 0,1 MBq, t½ = 59 Tage; Gamma-Strahlung 35 keV, x Strahlung 27 keV, 31 keV; lyophilisiert, enthält Natriumazid)
Rekonstitutionspuffer **H** RBU 1 x 6 mL	Lösung (gebrauchsfertig, enthält Natriumazid)
Präzipitationspuffer **J** PBU 1 x 55 mL	Lösung (gebrauchsfertig, enthält Natriumazid)
Protein A **L** PA 1 Lyophilisat	Suspension mit Protein A (lyophilisiert; enthält Natriumazid)
Qualitätskontrollzertifikat 1 Stück	-
Gebrauchsanweisung 1 Stück	-

5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Übliche Laborausrüstung
- Präzisionspipetten (5 – 1000 µL) und Einwegpipettenspitzen
- Spitzbodenprobenröhrchen und Probenrack
- Vortex Mixer oder anderer Rotator

- Zentrifuge
- γ-Counter
- Adsorbierendes Papier oder Papiertücher
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

6 LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Nach Erhalt müssen alle Testkomponenten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden, vorzugsweise in der Originalverpackung des Kits. Bei sachgemäßer Lagerung in den Originalbehältern sind alle Komponenten bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

7 ALLGEMEINE HINWEISE

Dieses Produkt ist nur für die *In-vitro*-Diagnostik bestimmt. Die Gebrauchsanweisung ist vor Anwendung sorgfältig zu lesen. Sie gilt nur für das vorliegende Produkt mit der angegebenen Zusammensetzung. Die Gebrauchsanweisung muss strikt befolgt werden, um zuverlässige Testergebnisse zu gewährleisten. Abweichungen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Komponenten dürfen nicht durch Testreagenzien anderer Chargen oder anderer Hersteller ausgetauscht werden.

Kontaminationen der Reagenzien müssen durch Anwendung aseptischer Techniken bei der Entnahme von Aliquots aus den Fläschchen vermieden werden. Nach Gebrauch müssen die Reagenzienfläschchen wieder fest mit den zugehörigen Deckeln verschlossen werden.

Kreuzkontaminationen von Proben oder Reagenzien können zu widersprüchlichen Testergebnissen führen und müssen durch Anwendung konsistenter Pipettiertechniken vermieden werden.

8 VORBEREITUNG

8.1 Vorbereitung von Reagenzien

Alle Komponenten müssen vor Gebrauch für mindestens 30 min auf Raumtemperatur (RT: 18 °C bis 25 °C) gebracht werden, mit Ausnahme des Präzipitationspuffers, der bis zur Verwendung bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden muss. Flüssige Reagenzien müssen zur Homogenisierung gut durchmischt werden.

8.1.1 Kalibratoren

Die Kalibratoren sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.
Kalibratoren müssen in jedem Testansatz mitgeführt werden.

8.1.2 Kontrollen

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.
Kontrollen müssen in jedem Testansatz mitgeführt werden. Alternativ können Laboratorien auch eigene Kontrollen validieren und verwenden.

8.1.3 Rekonstitutionspuffer

Der Rekonstitutionspuffer ist gebrauchsfertig und dient zur Rekonstituierung Tracers und Protein A.

8.1.4 Tracer

Der Tracer ist lyophilisiert und muss mit 2,6 mL Rekonstitutions-puffer pro Fläschchen rekonstituiert werden.
Der rekonstituierte Tracer ist bei 2 °C bis 8 °C gelagert für zwei Wochen haltbar.

8.1.5 Protein A

Protein A ist lyophilisiert und muss mit 2,6 mL Rekonstitutions-puffer pro Fläschchen rekonstituiert werden.
Die rekonstituierte Protein A Lösung ist bei 2 °C bis 8 °C gelagert für zwei Wochen haltbar.

8.1.6 Präzipitationspuffer

Der Präzipitationspuffer ist gebrauchsfertig und muss bis zur Verwendung bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

8.2 Vorbereitung der Proben

8.2.1 Probenmaterial

Die Verwendung frischer **Serumproben** aus venös entnommenem Blut wird empfohlen. Ikterische, lipämische, hämolytische oder bakteriell kontaminierte Proben sollten nicht verwendet werden. Unlösliche Bestandteile sollten durch Zentrifugation aus der Probe entfernt werden. Die Proben dürfen nicht thermisch inaktiviert werden.

8.2.2 Probenlagerung

Proben können bis zu drei Tagen bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben erfordert -20 °C. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Zur Mehrfachverwendung sollten die Proben aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt werden.

9 DURCHFÜHRUNG

9.1 Ablaufschema

Zur Durchführung des Immunoassays werden Spitzboden-röhrchen empfohlen. Eine ausreichende Anzahl an Probenröhrchen für Kalibratoren, Kontrollen und Proben muss vorbereitet werden inclusive eines zusätzlichen Probenröhrchens zur Analyse des isolierten Tracers als Referenz zur Bestimmung der Totalradioaktivität. Die angegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen müssen eingehalten und starke Zeitverschiebungen beim Pipettieren von Proben und Reagenzien vermieden werden.

Schritt	Beschreibung
1. Zugabe von Kalibratoren, Kontrollen und unverdünnten Proben	Zugabe von 20 µL gebrauchsfertiger Kalibratoren, Kontrollen und unverdünnten Proben pro Probenröhrchen. Vorbereiten eines zusätzlichen, Probenröhrchens für isoliertes Tracer Material zur Bestimmung der Totalaktivität T als Referenz.
2. Zugabe des Tracers	Zugabe von 50 µL Tracer Material (aus D und H) pro Probenröhrchen inklusive des zusätzlichen Probenröhrchens zur Bestimmung der Totalaktivität T als Referenz. Das zusätzliche Probenröhrchens zur Bestimmung der Totalaktivität T als Referenz bis zur Messung zur Seite stellen.
3. Inkubation	Inkubieren der Röhrchen **über Nacht (mindestens 18 Stunden) bei 2 °C bis 8 °C**
4. Zugabe von Protein A	Zugabe von 50 µL Protein A (aus L und H) pro Röhrchen und vortexen
5. Inkubation	Inkubieren der Röhrchen für **1 Stunde bei 2 °C bis 8 °C**
6. Zugabe des Präzipitations-puffers	Zugabe von 1 mL kaltem Präzipitationspuffer zu jedem Röhrchen und vortexen
7. Zentrifugation	Zentrifugieren der Röhrchen für **30 min bei 2 °C bis 8 °C** und 2000 x g
8. Dekantieren	Dekantieren oder Absaugen des Überstands aller Probenröhrchen Zum Entfernen der Restflüssigkeit, die Probenröhrchen kopfüber für 30 min auf saufähiges Papier stellen.
9. Analyse	Messung der Radioaktivität aller Probenröhrchen inclusive des Referenzröhrchens T mit einem γ-Counter und einer empfohlenen Messzeit von 1 min.

10 AUSWERTUNG

10.1 Metrologische Rückverfolgbarkeit

Der Immunoassay wurde an einer internen Referenzprobe kalibriert. Quantitative Ergebnisse werden in U/mL angegeben.

10.2 Quantitative Auswertung

Zur Erstellung einer Standardkurve wird die gemessene Radioaktivität (counts per minute, cpm) der Kalibratoren gegen ihre Antikörperaktivitäten aufgetragen und mit Hilfe spline smoothing korreliert. Unter Verwendung der so generierten Standardkurve können Antikörperaktivitäten unbekannter Proben direkt aus ihrer gemessenen Radioaktivität (counts per minute; cpm) abgeleitet werden.

Alternativ kann die quantitative Auswertung auch auf Basis der Bindungsraten B/T (%) erfolgen. Die Bindungsraten B/T (%) werden berechnet durch Division der gemessenen Radioaktivität (counts per minute; cpm) aller Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben mit der Totalradioaktivität T. Zur Erstellung einer Standardkurve wird die Bindungsraten B/T (%)der Kalibratoren gegen ihre Antikörperaktivitäten aufgetragen und mit Hilfe spline smoothing korreliert. Unter Verwendung der so generierten Standardkurve können Antikörperaktivitäten unbekannter Proben direkt aus ihrer gemessenen Bindungsraten B/T (%) abgeleitet werden.

10.3 Validitätskriterien

Ein Testlauf ist valide, wenn die nachfolgenden Validitätskriterien erfüllt sind:

- cpm or B/T (%) CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4 < CAL 5
- Die Kontrollen müssen eine Antikörperaktivität im Gültigkeitsbereich aufweisen, der auf dem Qualitätskontroll-zertifikat angegeben ist.

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf nicht valide und muss wiederholt werden.

10.4 Problembehandlung

Im Falle eines invaliden Testlaufs sollten die Haltbarkeiten und Lagerungsbedingungen, die Inkubationszeiten und –temperaturen sowie die präzise Kalibrierung der Pipetten und aller anderen Geräte überprüft werden. Sollte sich kein Grund für den invaliden Testlauf finden, kontaktieren Sie bitte den Anbieter oder Hersteller des Produkts.

10.5 Referenzbereiche

Die Referenzbereiche sind nachfolgend angegeben:

	Interpretation
Antikörperaktivität < 1 U/mL	negativ
Antikörperaktivität 1 - 2 U/mL	grenzwertig
Antikörperaktivität > 2 U/mL	positiv

Aufgrund der unterschiedlichen Seroprävalenzen in einzelnen Regionen sollte jedes Labor den Grenzwertbereich durch eigene Analysen verifizieren und ggf. anpassen.

10.6 Interpretation der Ergebnisse

Ein positives Ergebnis bestätigt die Anwesenheit spezifischer Antikörper. Ein negatives Ergebnis bestätigt die Abwesenheit spezifischer Antikörper, schließt jedoch eine Autoimmunreaktion nicht aus. Im Fall eines grenzwertigen Ergebnisses ist keine sichere Bewertung der Patientenprobe möglich.

10.7 Einschränkungen der Methode

Die Interpretation der Testergebnisse muss stets im Zusammen-hang mit dem klinischen Bild des Patienten erfolgen. Eine Diagnose sollte nicht allein auf den Ergebnissen einer individuellen diagnostischen Methode erfolgen, sondern immer unter Berücksichtigung aller klinischen und laboratoriumsmedizinischen Befunde erstellt werden. Zur Bestätigung sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

11 LEISTUNGSMERKMALE

11.1 Analytische Leistungsmerkmale

11.1.1 Analytische Sensitivität und Spezifität

Der Limit of Quantitation (LoQ) wurde mit einer Intra-Assay-Varianz von 10 % und einer Inter-Assay-Varianz von 20 % korreliert.

	Analytische Sensitivität
Limit of Quantitation (LoQ)	0,8 U/mL

Durch die hohe Qualität des Tracers ist im direkten Assay (s.a. Testprinzip) gesichert, dass nur anti-IA_2-Antikörper erfasst werden und nachweisbare Kreuzreaktionen mit Autoantikörpern gegen GAD_{65}, Insulin, Thyreoglobulin, thyreoidale Peroxidase, den TSH-Rezeptor und den Acetylcholin-Rezeptor nicht vorhanden sind.

11.1.2 Präzision

Die Präzision der Messergebnisse wurde durch die Bestimmung der Intra- und Interassay Varianz durch Analyse mehrerer Proben mit unterschiedlichen Antikörperaktivitäten ermittelt.

	Intra-Assay-Präzision		Inter-Assay-Präzision	
	U/mL	VK (%)	U/mL	VK (%)
Probe 1	0,8	10,4	0,9	18,5
Probe 2	5,8	4,2	6,1	3,0
Probe 3	24,7	2,6	24,8	2,0

11.1.3 Messbereich

Im Rahmen umfangreicher Leistungsbewertungsstudie wurden die Genauigkeit, Richtigkeit, Präzision, Linearität und Wieder-findung im Messbereich zwischen dem LoQ und dem höchsten Kalibrator nachgewiesen. Proben mit Ergebnissen oberhalb des höchsten Kalibrators sollten mit >max angegeben werden. Proben, mit Ergebnissen unterhalb des LoQ, sollten mit <min angegeben werden. Patientenproben mit Messwerten oberhalb des höchsten Kalibrators können in einer höheren Verdünnung analysiert werden. Zur Quantifizierung sind die erhaltenen Antikörperaktivitäten dann mit dem zusätzlichen Verdünnungs-faktor zu multiplizieren.

11.2 Diagnostische Leistungsmerkmale

11.2.1 Diagnostische Genauigkeit

Sensitivität und Spezifität wurden durch die Analyse von 42 Proben von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und 41 Proben unselektierter Blutspender ermittelt.

	Diagnostische Leistung
Sensitivität	88 %
Spezifität	95 %

12 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Das Produkt ist ausschließlich zur in vitro Diagnostik und nur für die Anwendung durch qualifiziertes, autorisiertes und geschultes Fachpersonal vorgesehen. Alle Testkomponenten und menschliche Proben sollten als potenziell gefährlich mit entsprechender Vorsicht behandelt werden. Gute Laborpraxis (GLP) und alle relevanten Vorschriften sollten eingehalten werden

Sollte das Produkt beschädigt oder die Produktinformationen einschließlich der Etikettierung falsch oder fehlerhaft sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller oder den Lieferanten.

Das Produkt enthält Präparationen menschlichen und / oder tierischen Ursprungs. Obwohl alle Materialien aus humanen Körperflüssigkeiten oder Organen zur Herstellung von Komponenten negativ auf HBsAg (Hepatitis B-Virus-surface Antigen), anti-HIV und anti-HCV Antikörper getestet wurden, müssen alle Komponenten und Patientenproben gemäß nationalen Gesetzen und anzuwendenden Richtlinien zur Biologischen Sicherheit als potenziell gefährlich eingestuft und entsprechend behandelt werden.

Da das Produkt potenziell gefährliche und / oder radioaktive Materialien enthält, sollten die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden: Beim Umgang mit Kitmaterial oder Proben nicht rauchen, essen oder trinken. Direkten Kontakt mit Kitmaterial oder Proben durch das Tragen von Schutzhandschuhen, Laborkittel und Schutzbrille vermeiden. Niemals Material mit dem Mund pipettieren. Verschüttetes Material sofort aufnehmen und die betroffene Oberfläche gründlich mit einem Dekontaminationsmittel reinigen. Nach Gebrauch gründlich Hände waschen.

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (< 0,1 %) als Konservierungsmittel und dürfen nicht verschluckt werden oder mit Haut oder Schleimhaut in Berührung kommen. Der möglichen Bildung von Schwermetallaziden in der Drainage ist durch ausreichende Spülung mit Wasser vorzubeugen.

Die Angaben im Sicherheitsdatenblatt zu möglichen Gefahren, Erste-Hilfe-Maßnahmen, Maßnahmen bei unbeabsichtigter Freisetzung großer Mengen, Handhabung und Lagerung, persönliche Schutzausrüstung, Hinweise zur Entsorgung sowie Angaben zur Toxikologie sind zu beachten.

Jeder schwerwiegende Vorfall im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats zu melden, in dem der Benutzer und / oder der Patient ansässig sind.

13 ENTSORGUNG

Zur Dekontamination und Entsorgung müssen die Empfehlungen der CDC sowie die jeweils geltenden lokalen und nationalen Richtlinien und gesetzlichen Vorschriften eingehalten werden. Proben, potentiell kontaminierte Materialien und infektiöse Abfälle müssen, z. B. durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C, dekontaminiert werden.

Einige der Reagenzien enthalten radioaktives Material. Kontaminierte Tücher, Röhrchen, Tischabdeckungen, Handschuhe usw. müssen in einem speziell gekennzeichneten Behälter entsorgt werden. Entsorgen Sie flüssige und feste radioaktive Abfälle nur so, wie es von den Bundes-, Landes- oder örtlichen Behörden und Vorschriften erlaubt ist. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Produkts, radioaktives Material in Übereinstimmung mit den nationalen gesetzlichen Vorschriften oder anderen Anweisungen der örtlichen Behörden zu handhaben.

14 REFERENCES / LITERATUR

1. Batstra MR, Anstoot HJ, Herbrink P: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using ß-cell autoantibodies. Clin. Lab. 2001, 47, 497 – 507.
2. Seissler J, Hatziagelaki E, Scherbaum WA: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 2001, 109: Suppl 2, 304 – 16.
3. Pozzilli P, Manfrini S, Monetini L: Biochemical markers of type 1 diabetes, clinical use. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl 2001, 235, 38 – 44.
4. Schernthaner G, Hink S, Kopp HP et al.: Progress in the characterization of slowly progressive autoimmune diabetes in adult patients (LADA or type 1.5 diabetes). Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 2001, 109 Suppl 2, 94 – 108.
5. Winter WE, Harris N, Schatz D: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. Clinical Diabetes 2002, 20, 183 – 91.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português
CE	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation	Consultar as instruções de uso
IVD	*In vitro* diagnostic medical device *	*In-vitro*-Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
REF	Catalogue number *	Katalognummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Número de catálogo
LOT	Batch code *	Chargen-bezeichnung *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código do lote
Σ	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> determinações
	Temperature limit *	Temperaturgrenzwerte *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Temperature de conservation	Limites de temperatura
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Prazo de validade
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante
	Distributor *	Vertriebspartner *	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuidor
	Date of manufacture *	Herstellungsdatum *	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production	Data de fabricação
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques	Riscos biológicos
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention	Cuidado
UDI	Unique device Identifier *	eindeutige Produktidentifizierung *	Identificativo unico del dispositivo*	Identificación exclusiva del dispositivo *	Identifiant de dispositif unique*	Identificador único do dispositivo *
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches	
Content	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité	Volume / Quantidade