



AIA-100

KIP0091

Read entire protocol before use.

AIA-100

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* semi-quantitative measurement of human free anti-insulin antibodies (AIA) in serum and plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource AIA-100 Kit
- B. **Catalog number :** KIP0091 : 100 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activity

The presence of circulating anti-insulin antibodies (AIA) in diabetics treated with insulin has been recognized as early as 1955. The highly purified insulin preparations, presently available, are less immunogenic than some of the previously used, less pure, preparations. Bovine insulin is more immunogenic than the porcine hormone. Also, it has recently been recognized that AIA may develop, in patients treated with human insulin.

The determination of circulating anti-insulin antibodies is of clinical importance for the following reasons :

- § The presence of free anti-insulin antibodies in plasma interferes with the determination of insulin by radioimmunoassay;
- § At very high titers, the anti-insulin antibodies may induce a state of insulin resistance;
- § Anti-insulin antibodies may influence the quality of the glycemetic control, in diabetic patients, by prolonging the half life of insulin.

B. Clinical applications

- § Evaluation of the presence of free anti-insulin antibodies prior to the determination of insulin levels, by radioimmunoassay, in patients having received previous insulin therapy ;
- § Evaluation of states of insulin resistance;
- § Adjunct to the diagnosis of surreptitious insulin injections (factitious insulin-induced hypoglycaemia);
- § Monitoring of the evaluation of anti-insulin antibodies, in patients receiving the newly formulated human insulin preparations (new cases; patients in whom a previous treatment with porcine or bovine insulin is replaced by the administration of human insulin).

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The presence of circulating anti-insulin antibodies in insulin treated diabetics is estimated on a semi-quantitative basis, by the determination of the binding of ¹²⁵I-Tyr-A14-insulin to the serum fraction precipitated by the polyethylene glycol (PEG) (gamma globulins).

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution
Ag¹²⁵I TRACER: ¹²⁵Iodine labelled INSULINE in phosphate buffer with bovine serum albumin , thymol and sodium azide (<0.1%)	1 vial 1 ml 74 kBq	red	Add 10 ml distilled water
CONTROLN Controls - N = 1 to 3 (see exact values on vial labels) in human serum with thymol	3 vials lyophilised	yellow	Add 1ml distilled water
PEG PEG: Polyethylene glycol (16%) in phosphate buffer with bovine serum albumin, Tween 20 and sodium azide (0.5%)	1 vial 105 ml	green	Ready for use

Negative Control: The first control contains no anti-insulin antibodies. It allows the determination of the non-specific tracer binding.

Positive Controls: The two other controls respectively contain low and high levels of bovine free anti-insulin antibodies.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- 1. Distilled water
- 2. Pipettes for delivery of: 100 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- 3. Disposable polystyrene tubes (12 x 75 mm)
- 4. Plastic or aluminium foil
- 5. Incubator at 37°C
- 6. Vortex mixer
- 7. Magnetic stirrer
- 8. Centrifuge operating at 1500 g
- 9. Aspiration system (optional)
- 10. Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Tracers:** Reconstitute the tracer with 10 ml distilled water.
- B. **Controls:** Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, tracer and controls are stable for 8 days at 2-8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum or plasma samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, storage at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- After thawing, the samples should be mixed and centrifuged.

X. PROCEDURE

- A. **Handling notes**
Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
Respect the incubation times.
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

- B. **Procedure**
 1. Label polystyrene tubes in duplicate for each control, sample and total counts.
 2. Briefly vortex controls and samples and dispense 100µl of each into the respective tubes.
 3. Dispense 100 µl of ¹²⁵Iodine labelled Insuline into each tube, including the tubes for total counts.
 4. Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
 5. Cover the tubes (with plastic or aluminium foil) and incubate for 2 hours at 37°C.
 6. Add 1 ml of the PEG solution (at room temperature) into each tube, except the total counts. Briefly vortex the tubes.
 7. Incubate for 15 minutes at room temperature.
 8. Centrifuge for 15 minutes at 1500 g. The use of a refrigerated centrifuge is not necessary, provided that the temperature does not rise up to 25°C.
 9. Immediately aspirate (or decant) the supernatants carefully from each tube (except total counts). Be careful not to disturb the precipitate.
 10. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- 1. Calculate the mean of duplicate determinations.
- 2. Calculate the bound radioactivity as a percentage of the total counts according to the following formula :

B/T (%) = $\frac{\text{Counts (Control or sample)}}{\text{Total Counts}} \times 100$

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time values.

AIA	cpm	B/T (%)
Total count	33780	
Controls:		
Negative Control	1265	3.7
Low Positive Control	6877	20.4
High Positive Control	19435	57.5
Sample 1	4054	12.0
Sample 2	7904	23.4
Sample 3	12363	36.3

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION				INTER-ASSAY PRECISION			
Serum	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)
A	15	3.2 ± 0.4	12.5	A	38	3.5 ± 0.7	20
B	15	20.4 ± 0.6	2.9	B	38	20.8 ± 1.0	4.8
C	15	59.6 ± 1.0	1.6		38	60.0 ± 2.0	3.3

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

The assay was performed on 80 sera of patients who never received insulin therapy. The observed binding percentage of ¹²⁵I-Tyr-A14-human-insulin was the following: 5.5 % ± 0.9 % (mean value ± 1 standard deviation). Consequently, one can consider that a binding percentage of ¹²⁵I-Tyr-A14-human-insulin higher than the mean value + 3 standard deviations (8.2 %) corresponds to the presence of circulating anti-insulin antibodies.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.
This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days) ,emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations. This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals. All radioactive handling should be executed in a designated area. away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.
Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.
The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.
All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.
Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.
Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. ASLIN C.M., HARTOG M. and GOLDIE D.J. (1978)
The relationship between circulating free and bound insulin, insulin antibodies, insulin dosage and diabetic control in insulin treated diabetics.
Acta Endocrinologica 87, 330-338.

2. BAXTER R.C., YVE D.K. and TURTLE T.R. (1976)
Equilibrium binding studies of insulin antibodies in diabetic subjects.
Clin. Chem. 2217, 1089-1094.

3. DECKERT T. and GRUNDALL E. (1970)
The antigenicity of pig insulin.
Diabetologia 6,15-20.

4. DESBUQUOIS B. and AURBACH G.D. (1971)
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptides hormones in radioimmunoassays.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 732-38.

5. DIXON K. (1974)
Measurement of antibodies to insulin in serum.
Clin. Chem. 20/10, 1275-1281.

6. DIXON K., EXON P.D. and MALINS H. (1975)
Insulin antibodies and the control of diabetes.
Quarterly Journal of Medicine, New Series, XLIV, n° 176, 543-53.

7. WALDHAUSL, W.K., BRATUSCH-MARRAIN P., KRUSE V., JENSEN Y., NOWOTNY Y. and VIERHAPPER H. (1985)
Effect of insulin antibodies on insulin pharmacokinetics and glucose utilization in insulin-dependent diabetic patients.
Diabetes 34: 166-173.

8. CHRISTIANSEN A.H. (1973)
Radioimmuno-electrophoresis in the determination of insulin binding to IgG. Methodological studies.
Horm. Metab. Res. 5: 147-154.

9. FALHOLT K., HOSKAM J.A.M., KARAMANOS B.G., SUSSTRUNK H., VISWANATHAN M. and HEDING L.G. (1983)
Insulin-specific IgE in serum of 67 diabetic patients against human insulin (NOVO), porcine insulin, and bovine insulin. Four cases reports.
Diabetes care 6: 61-65.

10. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S. and GOLDMAN J. (1983)
Effects of species of origin, purification levels and formulation on insulin immunogenicity.
Diabetes 32:592-599.

11. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S., RATHBUN M.J. and HUFFERD S. (1983)
Immunogenicity of recombinant DNA human insulin.
Diabetologica 25: 465-469.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS µl	SAMPLE(S) CONTROLS µl
Samples, controls Tracer	- 100	100 100
Incubation	2 hours at 37°C	
PEG	-	1000
Incubation Centrifugation Separation	15 minutes at room temperature 15 minutes at 1500 g Aspirate supernates	
Counting	Count tubes for 60 seconds	

DIAsource Catalogue Nr : KIP0091	P.I. Number : 1700439/en	Revision nr : 100813/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

AIA-100

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* des anticorps anti-insuline libres (AIA) dans le sérum ou le plasma humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource AIA-100 kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP0091 : 100 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

La présence des anticorps anti-insuline circulants (AIA) dans des diabétiques traités avec de l'insuline a déjà été découverte en 1955. Les préparations d'insuline très purifiées qui existent aujourd'hui sont moins immunogéniques que certaines préparations moins pures qui étaient utilisées auparavant. L'insuline bovine est plus immunogénique que l'hormone porcine. De même, il est reconnu que l'AIA peut se développer dans des patients qui sont traités avec de l'insuline humaine.

La détermination des anticorps anti-insuline circulants a une importance clinique pour les raisons suivantes:

- § La présence des anticorps anti-insuline libres dans le plasma interfère avec la détermination de l'insuline par un essai radio-immunologique;
- § A de très hautes valeurs, les anticorps anti-insuline peuvent induire un état de résistance contre l'insuline;
- § Les anticorps anti-insuline peuvent influencer la qualité du contrôle glycémique, dans des patients diabétiques, en prolongeant la demi-vie de l'insuline.

B. Applications cliniques

- § Evaluation de la présence d'anticorps anti-insuline libres avant la détermination des taux en insuline, par essai radio-immunologique, dans des patients qui ont déjà eu une thérapie d'insuline;
- § Evaluation des états de résistance contre l'insuline;
- § Moyen de diagnostic pour des piqûres d'insuline clandestines (hypoglycémie artificiellement induite par l'insuline);
- § Suivre l'évaluation des anticorps anti-insuline, dans les patients qui reçoivent les préparations d'insuline humaine formulée récemment (nouveaux cas; patients dans lesquels un traitement avec de l'insuline porcine ou bovine a été remplacé par l'administration de l'insuline humaine).

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La présence des anticorps anti-insuline circulants dans des diabétiques traités avec de l’insuline est déterminée à base semi-quantitative, par la détermination de la liaison de l’insuline ¹²⁵I-Tyr-A14 à la fraction sérique précipitée par le glycol polyéthylène (PEG) (globulines gamma).

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests	Code couleur	Reconstitution
Ag ¹²⁵I TRACEUR: Insuline marquée à l'¹²⁵Iodine dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine et de l'azide de sodium (<0,1%)	1 flacon 1 ml 74 kBq	rouge	Ajouter 10 ml d’eau distillée
CONTROL N Contrôles - N = 1 ou 3 dans du sérum humain avec du thymol	3 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 1 ml d’eau distillée
PEG PEG: Glycol Polyéthylène (16%) dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine, Tween 20 et de l'azide de sodium (0.5 %)	1 flacon 105 ml	Vert	Prêt à l’emploi

Contrôle négatif: le premier contrôle ne contient pas d’anticorps anti-insuline. Il permet la détermination de la liaison de traceur non-spécifique.
Contrôles positifs: les deux autres contrôles contiennent respectivement des taux bas et élevés en anticorps anti-insuline bovins.

VI. MATERIEL NON FOURNI

- Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:
- 1. Eau distillée
 - 2. Pipettes pour distribuer: 100 µl et 1 ml (l’utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
 - 3. Tubes en polystyrène jetables (12 x 75 mm)
 - 4. Papier aluminium ou en plastique
 - 5. Incubateur à 37°C
 - 6. Agitateur vortex
 - 7. Agitateur magnétique
 - 8. Centrifuge qui marche à 1500 g
 - 9. Système d’aspiration
 - 10. Tout compteur gamma capable de mesurer l’125I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Traceur:** Reconstituer le traceur avec 10 ml d’eau distillée.
- B. **Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 1 ml d’eau distillée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D’EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l’ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu’à la date d’expiration, indiquée sur l’étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, le traceur et les contrôles sont stables pendant 8 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à –20°C. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Des altérations dans l’apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L’ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum et de plasma doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n’est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Après la décongélation, les échantillons doivent être mélangés et puis centrifugés.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d’expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.
Mélanger à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l’addition de chaque réactif et échantillon.
Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d’augmenter la précision. Respecter les temps d’incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d’expériences, ne pas utiliser les données d’expériences précédentes.

B. Mode opératoire

- 1. Identifier un tube en polystyrène pour chaque échantillon, contrôle et les comptages totaux.
- 2. Agiter au vortex brièvement les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 100 µl de chacun d’eux dans leurs tubes respectifs.
- 3. Distribuer 100µl de l’ Insulin marquée à l’ 125Iodine dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l’activité totale.
- 4. Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d’air emprisonnée.
- 5. Couvrir les tubes (avec du papier aluminium ou en plastique) et incuber pendant 2 heures à 37°C.
- 6. Ajouter 1 ml de la solution PEG (à température ambiante) à chaque tube, sauf les comptages totaux. Vortexer les tubes brièvement.
- 7. Incuber pendant 15 minutes à température ambiante..
- 8. Centrifuger pendant 15 minutes à 1500 g. L’utilisation d’un centrifuge réfrigéré n’est pas nécessaire, si la température ne dépasse pas 25°C.
- 9. Aspirer (ou décanter) immédiatement avec précaution les supernatants de chaque tube (sauf les comptages totaux). Ne pas déranger le précipité.
- 10. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- 1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- 2. Calculer la radioactivité liée comme un pourcentage des comptages totaux selon la formule suivante:

$$B/T \text{ (}\%) = \frac{\text{Counts (Control or sample)}}{\text{Total Counts}} \times 100$$

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont données pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d’une courbe de calibration.

AIA	cpm	B/T (%)
Activité totale	33780	
Contrôles:		
Contrôle négatif	1265	3,7
Contrôle Positif Bas	6877	20,4
Contrôle Positif Elevé	19435	57,5
Echantillon 1	4054	12,0
Echantillon 2	7904	23,4
Echantillon 3	12363	36,3

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)
A	15	3,2 ± 0,4	12,5	A	38	3,5 ± 0,7	20
B	15	20,4 ± 0,6	2,9	B	38	20,8 ± 1,0	4,8
C	15	59,6 ± 1,0	1,6	C	38	60,0 ± 2,0	3,3

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

XIV. CONTROLE QUALITE INTERNE

- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d’échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d’acceptation pour les écarts des valeurs en duplicat des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont donnés à titre d’ information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

Le test a été effectué sur 80 sérums de patients qui n’avaient jamais eu de thérapie d’insuline. Le pourcentage de liaison de l’insuline humaine ¹²⁵I-Tyr-A14 était: 5,5% ± 0,9% (valeur moyenne ± 1 déviation standard). Par conséquent, on peut dire qu’un pourcentage de liaison de l’insuline humaine ¹²⁵I-Tyr-A14 plus élevé que la valeur moyenne + 3 déviations standard (8,2%) correspond à la présence d’anticorps anti-insuline circulants.

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité
Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.
Cette trousse contient de l’¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).
Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l’achat, le stockage, l’utilisation et l’échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l’homme ou aux animaux.
Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L’équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d’éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.
Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L’adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate
Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l’Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l’anti-HCV, l’anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l’assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d’hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d’animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l’ESB n’a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.
L’azide de sodium est nocif s’il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l’azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L’azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l’eau le matériel utilisé.
Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. ASLIN C.M., HARTOG M. and GOLDIE D.J. (1978)
The relationship between circulating free and bound insulin, insulin antibodies, insulin dosage and diabetic control in insulin treated diabetics.
Acta Endocrinologica 87, 330-338.

2. BAXTER R.C., YVE D.K. and TURTLE T.R. (1976)
Equilibrium binding studies of insulin antibodies in diabetic subjects.
Clin. Chem. 2217, 1089-1094.

3. DECKERT T. and GRUNDALL E. (1970)
The antigenicity of pig insulin.
Diabetologia 6,15-20.

4. DESBUQUOIS B. and AURBACH G.D. (1971)
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptides hormones in radioimmunoassays.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 732-38.

5. DIXON K. (1974)
Measurement of antibodies to insulin in serum.
Clin. Chem. 20/10, 1275-1281.

6. DIXON K., EXON P.D. and MALINS H. (1975)
Insulin antibodies and the control of diabetes.
Quarterly Journal of Medicine, New Series, XLIV, n° 176, 543-53.

7. WALDHAUSL, W.K., BRATUSCH-MARRAIN P., KRUSE V., JENSEN Y., NOWOTNY Y. and VIERHAPPER H. (1985)
Effect of insulin antibodies on insulin pharmacokinetics and glucose utilization in insulin-dependent diabetic patients.
Diabetes 34: 166-173.

8. CHRISTIANSEN A.H. (1973)
Radioimmuno-electrophoresis in the determination of insulin binding to IgG. Methodological studies.
Horm. Metab. Res. 5: 147-154.

9. FALHOLT K., HOSKAM J.A.M., KARAMANOS B.G., SUSSTRUNK H., VISWANATHAN M. and HEDING L.G. (1983)
Insulin-specific IgE in serum of 67 diabetic patients against human insulin (NOVO), porcine insulin, and bovine insulin. Four cases reports.
Diabetes care 6: 61-65.

10. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S. and GOLDMAN J. (1983)
Effects of species of origin, purification levels and formulation on insulin immunogenicity.
Diabetes 32:592-599.

11. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S., RATHBUN M.J. and HUFFERD S. (1983)
Immunogenicity of recombinant DNA human insulin.
Diabetologica 25: 465-469.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (µl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (µl)
Echantillons, contrôles Traceur	- 100	100 100
Incubation	2 heures at 37°C	
PEG	-	1000
Incubation Centrifugation Separation	15 minutes à temperature ambiante 15 minutes à 1500 g Aspirer le supernatant	
Comptage (radioactivité)	Temps de comptage des tubes : 60 secondes	

Numéro de catalogue DIASource : KIP0091	Numéro de P.I.: 1700439/fr	Numéro de révision : 100813/1
--	-------------------------------	----------------------------------

Lees het hele protocol vóór gebruik.

AIA-100

I. BEOOGD GEBRUIK

Radioimmunoassay voor de kwantitatieve bepaling *in vitro* van menselijke vrije anti-insuline antilichamen (AIA) in serum en plasma.

II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIAsource AIA-100 kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP0091: 100 testen.
- C. **Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, België.

**Voor technische assistentie of voor bestelinformatie
kunt u contact opnemen met :**
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Biologische activiteiten

De aanwezigheid van circulerende anti-insuline antilichamen (AIA) bij diabetici die behandeld worden met insuline is reeds in 1955 ontdekt. De hoogst gepurifiëerde insulinepreparaten die nu beschikbaar zijn, zijn minder immunogeen dan sommige, minder zuivere preparaten die vroeger gebruikt werden. Runderinsuline is meer immunogeen dan het varkenshormoon. Het wordt eveneens erkend dat AIA ontwikkeld kan worden bij patiënten die behandeld worden met humaan insuline.

De bepaling van de circulerende anti-insuline antilichamen is van klinisch belang omwille van de volgende redenen:

- § De aanwezigheid van vrije anti-insuline antilichamen in plasma komt tussen bij de bepaling van insuline door een radioimmunoassay;
- § Bij heel hoge waarden kunnen de anti-insuline antilichamen een toestand van insuline resistentie induceren;
- § Anti-insuline antilichamen kunnen de kwaliteit van de glycemische controle beïnvloeden bij diabetici door verlenging van het halfleven van insuline.

B. Klinische toepassingen

- § Evaluatie van de aanwezigheid van vrije anti-insuline antilichamen voor de bepaling van de insulinegehalten, door radioimmunoassay, bij patiënten die voorgaande insulinetherapie ondergaan hebben;
- § Evaluatie van de toestanden van insuline resistentie;
- § Hulp bij de diagnose van clandestiene insuline injecties (kunstmatige insuline-geïnduceerde hypoglycemie);
- § Opvolgen van de evaluatie van anti-insuline antilichamen, bij patiënten die nieuw geformuleerde humane insuline preparaten ontvangen (nieuwe gevallen; patiënten bij wie een voorgaande behandeling met varkens- of runderinsuline vervangen is door de toediening van humaan insuline).

IV. *BESCHRIJVING VAN DE METHODE*

De aanwezigheid van circulerende anti-insuline antilichamen in diabetici die behandeld worden met insuline wordt ingeschat op een semi-kwantitatieve basis door de bepaling van de binding van ¹²⁵I-Tyr-A14-insuline aan de serumfractie neergeslagen door polyethyleen glycol (PEG) (gamma globulines).

V. *GELEVERDE REAGENTIA*

Reagens	Kit voor 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie
Ag 125I Tracer : Insuline gelabeld met ¹²⁵jood in fosfaat buffer met bovien serum albumine, thymol en azide (< 0,1%)	1 flacon 1 ml 74 kBq	Rood	10 ml gedestilleerd water toevoegen
CONTROL N Controles : N = 1 of 3 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in humaan serum met thymol	3 flacons, gevries-droogd	geel	1 ml gedestilleerd water toevoegen
PEG PEG: Polyethyleen glycol (16%)) in fosfaat buffer met bovien serum albumine, Tween 20 en azide (0,5%)	1 flacon 105 ml	groen	Klaar voor gebruik

Negatieve Controle: de eerste controle bevat geen anti-insuline antilichamen. Het maakt de bepaling mogelijk van de niet specifieke tracerbinding.
Positieve Controles: de twee andere controles bevatten respectievelijk lage en hoge gehalten van runds anti-insuline antilichamen.

VI. *NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN*

- De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:
- 1. Gedestilleerd water.
 - 2. Pipetten voor een volume van 100 µl en 1 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
 - 3. Wegwerpbuisjes van polystyreen (12 x 75 mm)
 - 4. Plastic of aluminium folie
 - 5. Incubator bij 37°C
 - 6. Vortexmenger.
 - 7. Magnetische roerder.
 - 8. Centrifuge die werkt bij 1500 g
 - 9. Afzuigsysteem (facultatief).
 - 10. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I. Een maximale telefficiëntie moet worden gegarandeerd.

VII. *BEREIDING VAN HET REAGENS*

- A. **Tracer:** Reconstitueer de tracer met 10 ml gedestilleerd water.
- B. **Controles:** Reconstitueer de controles met 1 ml gedestilleerd water.

VIII. *OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA*

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de tracer en controles gedurende 8 dagen houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden. Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. *MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING*

- Serum en plasma monsters moeten bij 2-8°C bewaard worden.
- Indien de test niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Na het ontdooien moeten de stalen gemengd en gecentrifugeerd worden.

X. *PROCEDURE*

- A. Opmerkingen bij de procedure**
Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.
Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.
Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.
Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

- B. Procedure**
- 1. Label duidelijk één polystyreen tube voor elk staal, elke controle en de totaal tellingen.
 - 2. Vortex de monsters en controles gedurende korte tijd en distribueer 100 µl van elk in het desbetreffende buisje.
 - 3. Distribueer 100 µl tracer in elke tube, ook de totaal tellingen.
 - 4. Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtbellen vrijkomen.
 - 5. Bedek de buisjes (met plastic of aluminium folie) en incubeer gedurende 2 uur bij 37°C.
 - 6. Voeg 1 ml PEG oplossing (bij kamertemperatuur) toe aan elk buisje, behalve de totaal tellingen. Vortex de buisjes even.
 - 7. Incubeer gedurende 15 minuten bij kamer temperatuur.
 - 8. Centrifugeer gedurende 15 minuten bij 1500 g. Het gebruik van een gekoelde centrifuge is niet noodzakelijk, voorzien dat de temperatuur niet boven de 25°C stijgt.
 - 9. Aspireer (of decanteer) onmiddellijk de supernatanten zorgvuldig van elk buisje (behalve de totaal tellingen). Let erop het bezinksel niet te verstoren.
 - 10. Tel de buisjes in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. *BEREKENING VAN DE RESULTATEN*

- 1. Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
- 2. Bereken de gebonden radioactiviteit als het percentage van de totaal tellingen volgens de volgende formule:

$$B/T (%) = \frac{\text{Counts (Control or sample)}}{\text{Total Counts}} \times 100$$

XII. *KENMERKENDE GEGEVENS*

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

AIA	cpm	B/T (%)
Totaaltelling	33780	
Controles:		
Negatieve Controle	1265	3,7
Lage Positieve Controle	6877	20,4
Hoge Positieve Controle	19435	57,5
Monster 1	4054	12,0
Monster 2	7904	23,4
Monster 3	12363	36,3

XIII. *EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN*

Precisie

PRECISIE BINNEN EEN TEST

PRECISIE TUSSEN TESTEN

Serum	N	<X> ± SD (B/T x 100)	VC (%)	Serum	N	<X> ± SD (B/T x 100)	VC (%)
A	15	3,2 ± 0,4	12,5	A	38	3,5 ± 0,7	20
B	15	20,4 ± 0,6	2,9	B	38	20,8 ± 1,0	4,8
C	15	59,6 ± 1,0	1,6	C	38	60,0 ± 2,0	3,3

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van stalen moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XV. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

De test werd uitgevoerd op 80 sera van patiënten die nooit insulinetherapie ondergaan hebben. Het geobserveerde bindingspercentage van ¹²⁵I-Tyr-A14-humaan insuline was als volgt: 5,5% ± 0,9% (gemiddelde waarde ± 1 standaard deviatie). Bijgevolg kan men stellen dat een bindingspercentage van ¹²⁵I-Tyr-A14- humaan insuline hoger dan de gemiddelde waarde + 3 standaarddeviaties (8,2%) overeenkomt met de aanwezigheid van circulerende anti-insuline antilichamen.

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.
Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen) , dat ioniserende X- (28 keV) en γ-stralen (35.5 keV) uitzendt.
Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.
Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.
Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.
Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel besmettelijk.
Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.
Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVII. BIBLIOGRAFIE

1. ASLIN C.M., HARTOG M. and GOLDIE D.J. (1978)
The relationship between circulating free and bound insulin, insulin antibodies, insulin dosage and diabetic control in insulin treated diabetics.
Acta Endocrinologica 87, 330-338.

2. BAXTER R.C., YVE D.K. and TURTLE T.R. (1976)
Equilibrium binding studies of insulin antibodies in diabetic subjects.
Clin. Chem. 2217, 1089-1094.

3. DECKERT T. and GRUNDALL E. (1970)
The antigenicity of pig insulin.
Diabetologia 6,15-20.

4. DESBUQUOIS B. and AURBACH G.D. (1971)
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptides hormones in radioimmunoassays.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 732-38.

5. DIXON K. (1974)
Measurement of antibodies to insulin in serum.
Clin. Chem. 20/10, 1275-1281.

6. DIXON K., EXON P.D. and MALINS H. (1975)
Insulin antibodies and the control of diabetes.
Quarterly Journal of Medicine, New Series, XLIV, n° 176, 543-53.

7. WALDHAUSL, W.K., BRATUSCH-MARRAIN P., KRUSE V., JENSEN Y., NOWOTNY Y. and VIERHAPPER H. (1985)
Effect of insulin antibodies on insulin pharmacokinetics and glucose utilization in insulin-dependent diabetic patients.
Diabetes 34: 166-173.

8. CHRISTIANSEN A.H. (1973)
Radioimmuno-electrophoresis in the determination of insulin binding to IgG. Methodological studies.
Horm. Metab. Res. 5: 147-154.

9. FALHOLT K., HOSKAM J.A.M., KARAMANOS B.G., SUSSTRUNK H., VISWANATHAN M. and HEDING L.G. (1983)
Insulin-specific IgE in serum of 67 diabetic patients against human insulin (NOVO), porcine insulin, and bovine insulin. Four cases reports.
Diabetes care 6: 61-65.

10. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S. and GOLDMAN J. (1983)
Effects of species of origin, purification levels and formulation on insulin immunogenicity.
Diabetes 32:592-599.

11. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S., RATHBUN M.J. and HUFFERD S. (1983)
Immunogenicity of recombinant DNA human insulin.
Diabetologica 25: 465-469.

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL-TELLINGEN (µl)	MONSTER(S) CONTROLES (µl)
Monsters, controles Tracer	- 100	100 100
Incubatie	2 uur bij 37°C	
PEG	-	1000
Incubatie Centrifugatie Separatie	15 minuten bij kamer temperatuur 15 minuten aan 1500 g Aspireer de supernatant	
Telling	Tel buisjes gedurende 60 seconden	

DIAsource catalogusnummer: KIP0091	Bijsluiternummer : 1700439/nl	Revisienummer : 100813/1
---------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

AIA-100

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanen freien Anti-Insulin-Antikörpern (AIA) in Serum und Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource AIA-100 Kit
- B. **Katalognummer :** KIP0091 : 100 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

Die Anwesenheit von zirkulierenden Anti-Insulin-Antikörpern (AIA) bei mit Insulin behandelten Diabetikern wurde schon 1955 erkannt. Die hoch reinen Insulinzubereitungen, die heute zur Verfügung stehen, sind weniger immunogen als einige der früher verwendeten, weniger reinen Zubereitungen. Rinderinsulin ist immunogener als das Hormon vom Schwein. Weiters wurde erkannt, dass AIA sich in Patienten entwickeln können, die mit Humaninsulin behandelt werden.

Die Bestimmung von zirkulierenden Anti-Insulin-Antikörpern ist aus den folgenden Gründen von klinischer Bedeutung:

- § Die Anwesenheit von freien Anti-Insulin-Antikörpern im Plasma interferiert mit der Bestimmung von Insulin im Radio-Immunoassay;
- § Bei sehr hohen Titern können die Anti-Insulin-Antikörper einen Zustand von Insulinresistenz induzieren;
- § Anti-Insulin-Antikörper können die Qualität der glykämischen Kontrolle bei Diabetikern beeinflussen, da sie die Halbwertszeit von Insulin verlängern.

B. Klinische Anwendungen

- § Beurteilung der Anwesenheit von freien Anti-Insulin-Antikörpern vor der Bestimmung des Insulinspiegels durch Radio-Immunoassay bei Patienten, die früher schon mit Insulin therapiert wurden;
- § Beurteilung von Insulinresistenzzuständen;
- § In Kombination mit der Diagnose von unzulässigen Insulininjektionen (künstliche Insulin-induzierte Hypoglykämie);
- § Kontrolle der Beurteilung von Anti-Insulin-Antikörpern bei Patienten, die die neu zusammengesetzten Humaninsulinzubereitungen erhalten (neue Fälle; Patienten, bei denen eine frühere Behandlung mit Insulin vom Schwein oder Rind durch die Verabreichung von Humaninsulin ersetzt wird).

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Die Anwesenheit von zirkulierenden Anti-Insulin-Antikörpern bei mit Insulin behandelten Diabetikern wird auf einer semi-quantitativen Basis beurteilt, und zwar durch die Bestimmung der Bindung von ¹²⁵I-Tyr-A14-Insulin an die Serumfraktion, die durch das Polyethylenglykol (PEG) (Gammaglobuline) ausgefällt wurde.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	100 Test Kit	Farbcode	Rekonstitution
Ag ¹²⁵I Tracer : ¹²⁵Iod markiertes Insulin in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin mit thymol und Azid (<0,1%)	1 Gefäß 1 ml 74 kBq	Rot	10 ml dest. Wasser zugeben
CONTROL N Kontrollen : N = 1 oder 3 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum und thymol	3 Gefäße lyophilisiert	Gelb	1 ml dest. Wasser zugeben
PEG PEG: Polyethylenglykol (16%) in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin, Tween 20 und Azid (0,5%)	1 Gefäß 105 ml	Grün	gebrauchsfertig

Negative Kontrolle: Die erste Kontrolle enthält keine Anti-Insulin-Antikörper. Sie ermöglicht die Bestimmung der unspezifischen Tracer-Bindung.
Positive Kontrollen: Die beiden anderen Kontrollen enthalten respektive niedrige und hohe Werte von bovinen Anti-Insulin-Antikörpern.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 100 µl und 1 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
3. Einwegpolystyrenröhrchen (12 x 75 mm)
4. Kunststoff- oder Aluminiumfolie
5. Inkubator bei 37°C
6. Vortexmixer
7. Magnetrührer
8. Zentrifuge (1.500 g)
9. Absaugsystem (optional)
10. Jeder Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Tracer:** Rekonstituieren Sie die Tracer mit 10 ml dest. Wasser.
- B. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1 ml dest. Wasser.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der Rekonstitution sind Kontrollen bei 2 bis 8°C 8 Tage stabil. Für eine längere Aufbewahrung für bis zu 3 Monaten sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serum- und Plasmaproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20°C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Nach dem Auftauen müssen die Proben gemischt und zentrifugiert werden.

X. DURCHFÜHRUNG

- A. **Bemerkungen zur Durchführung**
Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum. Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.
Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

- B. **Durchführung**
1. Beschriften Sie die Polystyrenröhrchen zweimal für jede Kontrolle, Probe und Gesamt.
2. Vortexen Sie Proben und Kontrollen kurz und geben Sie 100 µl von jedem in ihre Röhrchen.
3. Geben Sie 100 µl des ¹²⁵I-markierten Insulin in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
4. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
5. Decken Sie die Röhrchen (mit Kunststoff- oder Aluminiumfolie) ab und inkubieren Sie 2 Stunden bei 37°C.
6. Pipettieren Sie 1 ml der PEG-Lösung (bei Raumtemperatur) in jedes Röhrchen, außer Gesamt. Röhrchen kurz vortexen.
7. Inkubieren Sie 15 Minuten bei Raumtemperatur.
8. Zentrifugieren Sie 15 Minuten lang auf 1.500 g. Die Verwendung einer gekühlten Zentrifuge ist nicht erforderlich, wenn die Temperatur nicht auf über 25°C steigt.
9. Saugen Sie die Überstände sofort von jedem Röhrchen ab (außer Gesamt) - auch Dekantieren ist möglich. Achten Sie darauf, das Präzipitat nicht zu stören.
10. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden lang aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2. Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz von Gesamt nach folgender Formel:

$$B/T (\%) = \frac{\text{Counts (Control or sample)}}{\text{Total Counts}} \times 100$$

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrationskurve verwendet werden.

AIA	cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität	33780	
Kontrollen:		
Negative Kontrolle	1265	3,7
Niedrige Positive Kontrolle	6877	20,4
Hohe Positive Kontrolle	19435	57,5
Probe 1	4054	12,0
Probe 2	7904	23,4
Probe 3	12363	36,3

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

Präzision							
INTRA-ASSAY PRÄZISION				INTER-ASSAY PRÄZISION			
Serum	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)
A	15	3,2 ± 0,4	12,5	A	38	3,5 ± 0,7	20
B	15	20,4 ± 0,6	2,9	B	38	20,8 ± 1,0	4,8
C	15	59,6 ± 1,0	1,6	C	38	60,0 ± 2,0	3,3

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Der Assay wurde an 80 Seren von Patienten durchgeführt, die noch nie eine Insulinbehandlung erhalten hatten. Der beobachtete Bindungsprozentsatz von ¹²⁵I-Tyr-A14-HumanInsulin betrug 5,5% ± 0,9% (Durchschnittswert ± 1 Standardabweichung). Daher kann man davon ausgehen, dass ein Bindungsprozentsatz von ¹²⁵I-Tyr-A14-HumanInsulin über dem Durchschnittswert + 3 Standardabweichungen (8,2%) die Anwesenheit von zirkulierenden Anti-Insulin-Antikörpern angibt.

XVI. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit
Nur für diagnostische Zwecke.
Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen) , das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert. Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbraucher. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.
Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern.
Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.
Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit darüber liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.
Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.
Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflußrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.
Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

1. ASLIN C.M., HARTOG M. and GOLDIE D.J. (1978)
The relationship between circulating free and bound insulin, insulin antibodies, insulin dosage and diabetic control in insulin treated diabetics.
Acta Endocrinologica 87, 330-338.
2. BAXTER R.C., YVE D.K. and TURTLE T.R. (1976)
Equilibrium binding studies of insulin antibodies in diabetic subjects.
Clin. Chem. 2217, 1089-1094.
3. DECKERT T. and GRUNDALL E. (1970)
The antigenicity of pig insulin.
Diabetologia 6,15-20.

4. DESBUQUOIS B. and AURBACH G.D. (1971)
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptides hormones in radioimmunoassays.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 732-38.
5. DIXON K. (1974)
Measurement of antibodies to insulin in serum.
Clin. Chem. 20/10, 1275-1281.
6. DIXON K., EXON P.D. and MALINS H. (1975)
Insulin antibodies and the control of diabetes.
Quarterly Journal of Medicine, New Series, XLIV, n° 176, 543-53.
7. WALDHAUSL, W.K., BRATUSCH-MARRAIN P., KRUSE V., JENSEN Y., NOWOTNY Y. and VIERHAPPER H. (1985)
Effect of insulin antibodies on insulin pharmacokinetics and glucose utilization in insulin-dependent diabetic patients.
Diabetes 34: 166-173.
8. CHRISTIANSEN A.H. (1973)
Radioimmuno-electrophoresis in the determination of insulin binding to IgG. Methodological studies.
Horm. Metab. Res. 5: 147-154.
9. FALHOLT K., HOSKAM J.A.M., KARAMANOS B.G., SUSSTRUNK H., VISWANATHAN M. and HEDING L.G. (1983)
Insulin-specific IgE in serum of 67 diabetic patients against human insulin (NOVO), porcine insulin, and bovine insulin. Four cases reports.
Diabetes care 6: 61-65.
10. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S. and GOLDMAN J. (1983)
Effects of species of origin, purification levels and formulation on insulin immunogenicity.
Diabetes 32:592-599.
11. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S., RATHBUN M.J. and HUFFERD S. (1983)
Immunogenicity of recombinant DNA human insulin.
Diabetologica 25: 465-469.

XVIII.ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT (µl)	PROBE(N)- KONTROLLEN (µl)
Proben, Kontrollen Tracer	- 100	100 100
Inkubation	2 Std. Bei 37°C	
PEG	-	1000
Inkubation Zentrifugation Separation	15 Minuten bei Raumtemperatur 15 Minuten bei 1500 g Überstand absaugen	
Auswertung	Messen der Röhrchen 60 Sekunden	

DIAsource Katalognummer : KIP0091	Beipackzettell- nummer : 1700439/de	Nummer der Originalausgabe : 100813/1
--------------------------------------	---	---

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

AIA-100

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro degli anticorpi anti-insulina liberi (AIA) in siero o plasma.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource AIA-100 Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP0091: 100 test
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0) 67 88.99.99

Fax: +32 (0) 67 88.99.96

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

La presenza di anticorpi anti-insulina (AIA) circolanti nei pazienti diabetici trattati con insulina, è stata riconosciuta intorno al 1955. Le preparazioni di insulina altamente purificate attualmente disponibili sono meno immunogene rispetto ad alcune di quelle meno pure precedentemente utilizzate. L'insulina bovina è più immunogena rispetto all'ormone suino. Inoltre, è stato dimostrato che gli AIA possono svilupparsi anche nei pazienti trattati con insulina umana.

La determinazione degli anticorpi anti-insulina circolanti è di importanza clinica per i seguenti motivi:

- § La presenza di anticorpi anti-insulina liberi nel plasma interferisce con la determinazione dell'insulina mediante test radioimmunologico;
- § A titoli molto alti, gli anticorpi anti-insulina possono indurre uno stato di insulino-resistenza;
- § Gli anticorpi anti-insulina possono influenzare la qualità del controllo glicemico, nei pazienti diabetici, in quanto prolungano l'emivita dell'insulina.

B. Applicazioni cliniche

- § Valutazione della presenza di anticorpi anti-insulina liberi prima della determinazione dei livelli di insulina, mediante test radioimmunologico, in pazienti che hanno ricevuto una precedente terapia insulinica;
- § Valutazione degli stati di insulino-resistenza;
- § Ausilio alla diagnosi di iniezioni surretizie di insulina (ipoglicemia fittizia insulina-indotta);
- § Monitoraggio della valutazione di anticorpi anti-insulina, in pazienti che ricevono le preparazioni di insulina umana formulate di recente (nuovi casi; pazienti in cui un trattamento precedente con insulina suina o bovina viene sostituito dalla somministrazione di insulina umana).

IV. PRINCIPIO DEL METODO

La presenza di anticorpi anti-insulina circolanti nei soggetti diabetici trattati con insulina viene stimata su base semi-quantitativa, mediante la determinazione del legame della ¹²⁵I-Tyr-A14-insulina alla frazione sierica precipitata dal polietilenglicole (PEG) (gamma globuline).

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 100 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
Ag¹²⁵I Marcato: Insulin marcato con ¹²⁵I, in tampone fosfato con BSA, timolo e sodio azide (<0,1%)	1 fiala 1ml 74 kBq	rosso	Aggiungere 10 ml di acqua distillata
CONTROLN Controlli: N = 1 o 3, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei fialoni) in siero umano e timolo	3 fialoni liofilizzati	argento	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
PEG PEG: Polietilenglicole (16%) in tampone fosfato con BSA, Tween 20 e sodio azide (0,5%)	1 fiala 105 ml	Verde	Pronte per l'uso

Controllo negativo: Il primo controllo non contiene anticorpi anti-insulina. Consente la determinazione del legame del *tracer* non-specifico.
Controlli positivi: Gli altri due controlli contengono rispettivamente livelli bassi e alti di anticorpi anti-insulina bovini.

VI. REATTIVI NON FORNITI

- Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.
- 1. Acqua distillata.
 - 2. Pipette per dispensare 100 µl e 1 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
 - 3. Provette monouso in polistirene (12 x 75 mm)
 - 4. Pellicola in plastica o in alluminio
 - 5. Incubatrice a 37°C
 - 6. Agitatore tipo vortex.
 - 7. Agitatore magnetico.
 - 8. Centrifuga che funzioni a 1500 g
 - 9. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
 - 10. Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Marcato:** Ricostituire i marcato con 10 ml di acqua distillata.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 1 ml di acqua distillata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 8 giorni a 2-8°C e, suddivisi in aliquote a -20°C per periodi più lunghi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero o plasma a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Miscelare e centrifugare i campioni dopo lo scongelamento.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.
Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

1. Etichettare le provette in polistirene in duplicato per ogni controllo, campione e conteggi totali.
2. Agitare brevemente su vortex campioni e controlli. Dispensare 100 µl di campioni e controlli nelle rispettive provette.
3. Dispensare 100 µl di Insulin marcato con ¹²⁵I in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
4. Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
5. Coprire le provette (con la pellicola in plastica o alluminio) e incubare 2 ore a 37°C.
6. Aggiungere 1 ml di soluzione PEG (a temperatura ambiente) in ogni provetta, ad esclusione di quella per i conteggi totali. Agitare brevemente su vortex le provette.
7. Incubare 15 minuti a temperatura ambiente.
8. Centrifugare per 15 minuti a 1500 g. L'uso di una centrifuga refrigerata non è necessario, a condizione che la temperatura non si elevi oltre i 25°C.
9. Aspirare immediatamente (o decantare) i supernatanti con attenzione da ogni provetta (ad esclusione di quella per i conteggi totali). Prestare attenzione a non toccare il precipitato.
10. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2. Calcolare la radioattività del legame come percentuale dei conteggi totali in base alle formule seguenti:

$$B/T (\%) = \frac{\text{Counts (Control or sample)}}{\text{Total Counts}} \times 100$$

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di anticorpi anti-insulina in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

AIA	cpm	B/T (%)
Attività totale	33780	
Controlli:		
Controllo negativo	1265	3,7
Controllo positivo basso	6877	20,4
Controllo positivo alto	19435	57,5
Campioni 1	4054	12,0
Campioni 2	7904	23,4
Campioni 3	12363	36,3

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

Precisione							
INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)
A	15	3,2 ± 0,4	12,5	A	38	3,5 ± 0,7	20
B	15	20,4 ± 0,6	2,9	B	38	20,8 ± 1,0	4,8
C	15	59,6 ± 1,0	1,6	C	38	60,0 ± 2,0	3,3

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori sono puramente indicativi, ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli normali.

Il test è stato effettuato su 80 sieri di pazienti che non avevano mai ricevuto terapia con insulina. La percentuale di legame osservata di umana insulina ¹²⁵I-Tyr-A14 è stata la seguente: 5,5% ± 0,9% (valore medio ± 1 deviazione standard). Di conseguenza, è possibile considerare che una percentuale di legame di umana insulina-¹²⁵I-Tyr-A14 maggiore rispetto al valore medio + 3 deviazioni standard (8,2%) corrisponde alla presenza di anticorpi circolanti anti-insulina.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza
Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti. L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.
Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.
In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.
Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.
Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.
Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. ASLIN C.M., HARTOG M. and GOLDIE D.J. (1978)
The relationship between circulating free and bound insulin, insulin antibodies, insulin dosage and diabetic control in insulin treated diabetics.
Acta Endocrinologica 87, 330-338.
2. BAXTER R.C., YVE D.K. and TURTLE T.R. (1976)
Equilibrium binding studies of insulin antibodies in diabetic subjects.
Clin. Chem. 2217, 1089-1094.
3. DECKERT T. and GRUNDALL E. (1970)
The antigenicity of pig insulin.
Diabetologia 6,15-20.

4. DESBUQUOIS B. and AURBACH G.D. (1971)
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptides hormones in radioimmunoassays.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 732-38.
5. DIXON K. (1974)
Measurement of antibodies to insulin in serum.
Clin. Chem. 20/10, 1275-1281.
6. DIXON K., EXON P.D. and MALINS H. (1975)
Insulin antibodies and the control of diabetes.
Quarterly Journal of Medicine, New Series, XLIV, n? 176, 543-53.
7. WALDHAUSL, W.K., BRATUSCH-MARRAIN P., KRUSE V., JENSEN Y., NOWOTNY Y. and VIERHAPPER H. (1985)
Effect of insulin antibodies on insulin pharmacokinetics and glucose utilization in insulin-dependent diabetic patients.
Diabetes 34: 166-173.
8. CHRISTIANSEN A.H. (1973)
Radioimmuno-electrophoresis in the determination of insulin binding to IgG. Methodological studies.
Horm. Metab. Res. 5: 147-154.
9. FALHOLT K., HOSKAM J.A.M., KARAMANOS B.G., SUSSTRUNK H., VISWANATHAN M. and HEDING L.G. (1983)
Insulin-specific IgE in serum of 67 diabetic patients against human insulin (NOVO), porcine insulin, and bovine insulin. Four cases reports.
Diabetes care 6: 61-65.
10. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S. and GOLDMAN J. (1983)
Effects of species of origin, purification levels and formulation on insulin immunogenicity.
Diabetes 32:592-599.
11. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S., RATHBUN M.J. and HUFFERD S. (1983)
Immunogenicity of recombinant DNA human insulin.
Diabetologia 25: 465-469.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale µl	Campioni Controlli (µl)
Campioni, controlli Marcato	- 100	100 100
Incubazione	2 ore a 37°C	
PEG	-	1000
Incubazione Centrifugazione Separazione	15 minuti a temperatura ambiente 15 minuti a 1500 g Aspirare il supernatante	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto	

Numero di catalogo di DIAsource : KIP0091	P.I. numero : 1700439/it	Revisione numero: 100813/1
--	-----------------------------	-------------------------------



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

AIA-100

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de los anticuerpos anti-insulina libres (AIA) humanos en suero y plasma.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIASource AIA-100 Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP0091 : 100 tests
- C. **Fabricado por:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades biológicas

La presencia de anticuerpos anti-insulina circulantes (AIA) en diabéticos tratados con la insulina ya es conocida desde hace 1955. Las preparaciones muy puras que son disponibles ahora son menos inmunogénicas que unas preparaciones menos puras que fueron utilizadas antes. La insulina bovina es más inmunogénica que la hormona porcina. También ha sido descubierto que los AIA pueden desarrollarse en pacientes tratados con la insulina humana.

La determinación de los anticuerpos anti-insulina libres tiene una importancia clínica para :

- § La presencia de los anticuerpos anti-insulina libres en plasma influencia la determinación de insulina por radioinmunoensayo ;
- § Con valores muy elevados, los anticuerpos anti-insulina pueden inducir un estado de resistencia a la insulina ;
- § Los anticuerpos anti-insulina puede influenciar la calidad del control glicémico, en pacientes diabéticos, por la prolongación de la vida media de la insulina.

B. Aplicaciones clínicas

- § Evaluación de la presencia de los anticuerpos anti-insulina libres antes de la determinación de los niveles de insulina, por radioinmunoensayo, en pacientes que ya han experimentado una terapia con insulina ;
- § Evaluación de los estados de la resistencia a la insulina ;
- § Medio por el diagnóstico de inyecciones con insulina clandestinas (hipoglicemia artificialmente inducida por la insulina factitious insulin-induced hypoglycaemia);
- § Observación de la evaluación de los anticuerpos anti-insulina, en pacientes tratados con las nuevas preparaciones de insulina humana (casos nuevos; pacientes con quienes un tratamiento anterior con insulina porcina o bovina ha sido reemplazado por la administración de insulina humana).

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

La presencia de los anticuerpos anti-insulina circulantes en diabéticos tratados con insulina es determinada a base semi-cuantitativa, por la determinación de la ligación de la insulina ¹²⁵I-Tyr-A14 a la fracción del suero precipitada por el glicol polietileno (PEG) (gamma globulinas).

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit 100 test	Código de Color	Reconstitución
Ag ¹²⁵I TRAZADOR:Insulin marcado con I¹²⁵ en tampón fosfático con albumen bovino, timol y azida (<0,1%)	1 vial 1 ml 74 kBq	rojo	Añadir 10 ml de agua destilada
CONTROLN Controles - N = 1 o 3 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero humano y timol	3 viales liofilizados	plateado	Añadir 1 ml de agua destilada
PEG PEG: Glicol Polietileno (16%) en tampón fosfático con albumen bovino, Tween 20 y azida (0,5%)	1 vial 105 ml	verde	Listo para uso

Control Negativo: el primer control no contiene anticuerpos anti-insulina. Permite la determinación de la ligación al trazador no específica.
Controles Positivos: los otros dos controles contienen respectivamente niveles bajos y elevados de anticuerpos anti-insulina bovina.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit

- Agua destilada
- Pipetas de 100µl y 1 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
- Tubos polistirenos desechables (12 x 75 mm)
- Hoja de plástico o de alumio
- Incubador a 37°C
- Vortex
- Agitador magnético
- Centrifugador a 1500 g
- Sistema de aspiración (opcional)
- Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. **Trazador:** Reconstituir trazador con 10 ml de agua destilada.
B. **Controles:** Reconstituir los controles con 1 ml de agua destilada.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Después de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante 8 días a 2-8°C. Para periodos más largos, alicuotar y guardar a – 20°C. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero y plasma deben ser guardadas a 2-8°C. Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a –20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- Después de la descongelación, las muestras deben ser mezcladas y centrifugadas.

X. PROTOCOLO

- A. **Notas de manejo**
No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Agitar municiosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

- B. **Protocolo**
- Marcar los tubos polistirenos en duplicado para cada control, muestra y las cuentas totales.
 - Agitar brevemente los muestras y controles y dispensar 100 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
 - Dispensar 100 µl de Insulin marcado con I125 en cada tubo, incluyendo los tubos descubiertos a las Cuentas Totales.
 - Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier barbuja cautiva de las paredes de los tubos.
 - Cubrir los tubos (con un hoja de plástico o de aluminio) y incubar durante 2 horas a 37°C.
 - Añadir 1 ml de la solución PEG (a temperatura ambiente) en cada tubo, excepto las cuentas totales. Brevemente vortexar los tubos.
 - Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
 - Centrifugar durante 15 minutos a 1500 g. La utilización de un centrifugador refrigerado no es necesario si la temperature no excede a 25°C.
 - Inmediatamente aspirar (o decanter) prudentemente los supernatants de cada tubo (excepto cuentos totales). No perturbar la precipitación.
 - Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

- Calcular la media de los duplicados.
- Calcular la radiactividad ligada como un porcentaje de las cuentas totales según la formula siguiente :

B/T (%) = $\frac{\text{Counts (Control or sample)}}{\text{Total Counts}}$ x100

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

AIA	Cpm	B/T (%)
Cuentas Totales	33780	
Controles:		
Control negativo	1265	3,7
Control bajo positivo	6877	20,4
Control elevado positivo	19435	57,5
Muestra 1	4054	12,0
Muestra 2	7904	23,4
Muestra 3	12363	36,3

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

Precision				PRECISION INTRA-ENSAYO				PRECISION INTER-ENSAYO			
Suero	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)
A	15	3,2 ± 0,4	12,5	A	38	3,5 ± 0,7	20	A	38	3,5 ± 0,7	20
B	15	20,4 ± 0,6	2,9	B	38	20,8 ± 1,0	4,8	B	38	20,8 ± 1,0	4,8
C	15	59,6 ± 1,0	1,6	C	38	60,0 ± 2,0	3,3	C	38	60,0 ± 2,0	3,3

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados in duplo de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de pauta; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

El ensayo fue efectuado con 80 sueros de pacientes que nunca experimentaron una terapia con insulina. El porcentaje de ligación observado de la humana insulina ¹²⁵I-Tyr-A14 fue: 5,5% ± 0,9% (valor medio ± 1 desviación estandar). Consecuentemente, podemos decir que un porcentaje de ligación de la humana insulina ¹²⁵I-Tyr-A14 superior al valor medio + 3 desviaciones estandares (8,2 %) coincide con la presencia de anticuerpos anti-insulina circulantes.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.
Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.
Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.
Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.
Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.
Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.
Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.
No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. ASLIN C.M., HARTOG M. and GOLDIE D.J. (1978)
The relationship between circulating free and bound insulin, insulin antibodies, insulin dosage and diabetic control in insulin treated diabetics.
Acta Endocrinologica 87, 330-338.

2. BAXTER R.C., YVE D.K. and TURTLE T.R. (1976)
Equilibrium binding studies of insulin antibodies in diabetic subjects.
Clin. Chem. 2217, 1089-1094.

3. DECKERT T. and GRUNDALL E. (1970)
The antigenicity of pig insulin.
Diabetologia 6,15-20.

4. DESBUQUOIS B. and AURBACH G.D. (1971)
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptides hormones in radioimmunoassays.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 732-38.

5. DIXON K. (1974)
Measurement of antibodies to insulin in serum.
Clin. Chem. 20/10, 1275-1281.

6. DIXON K., EXON P.D. and MALINS H. (1975)
Insulin antibodies and the control of diabetes.
Quarterly Journal of Medicine, New Series, XLIV, n° 176, 543-53.

7. WALDHAUSL, W.K., BRATUSCH-MARRAIN P., KRUSE V., JENSEN Y., NOWOTNY Y. and VIERHAPPER H. (1985)
Effect of insulin antibodies on insulin pharmacokinetics and glucose utilization in insulin-dependent diabetic patients.
Diabetes 34: 166-173.

8. CHRISTIANSEN A.H. (1973)
Radioimmuno-electrophoresis in the determination of insulin binding to IgG. Methodological studies.
Horm. Metab. Res. 5: 147-154.

9. FALHOLT K., HOSKAM J.A.M., KARAMANOS B.G., SUSSTRUNK H., VISWANATHAN M. and HEDING L.G. (1983)
Insulin-specific IgE in serum of 67 diabetic patients against human insulin (NOVO), porcine insulin, and bovine insulin. Four cases reports.
Diabetes care 6: 61-65.

10. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S. and GOLDMAN J. (1983)
Effects of species of origin, purification levels and formulation on insulin immunogenicity.
Diabetes 32:592-599.

11. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S., RATHBUN M.J. and HUFFERD S. (1983)
Immunogenicity of recombinant DNA human insulin.
Diabetologica 25: 465-469.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (µl)
Muestras, controles Trazador	- 100	100 100
Incubación	2 horas a 37°C	
PEG	-	1000
Incubación Centrifugación Separación	15 minutos a temperatura ambiente 15 minutos a 1500 g Aspirar el supernatante	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos	

DIAsource Catalogo Nr : KIP0091	P.I. Numero : 1700439/es	Revisión nr : 100813/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

AIA-100

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την *in vitro* ημι-ποσοτική μέτρηση ελεύθερων ανθρώπινων αντινισουλινικών αντισωμάτων (AIA) σε ορό και πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία: Κιτ AIA-100 της DIAsource
- B. Αριθμός καταλόγου: KIP0091: 100 προσδιορισμοί
- Γ. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99 Φαξ: +32 (0)67 88.99.96

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

Η παρουσία κυκλοφορούντων αντινισουλινικών αντισωμάτων (AIA) σε διαβητικούς που υποβάλλονται σε θεραπεία με ινσουλίνη εντοπίστηκε ήδη από το 1955. Τα εξαιρετικά υψηλής καθαρότητας σκευάσματα ινσουλίνης, που διατίθενται σήμερα, είναι λιγότερο ανοσογόνα από μερικά από τα λιγότερο καθαρά σκευάσματα που χρησιμοποιούνταν παλαιότερα. Η βόεια ινσουλίνη είναι λιγότερο ανοσογόνος από το χοίρεια ινσουλίνη. Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι ενδέχεται να αναπτυχθούν AIA σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με ανθρώπινη ινσουλίνη.

Ο προσδιορισμός κυκλοφορούντων αντινισουλινικών αντισωμάτων είναι σημαντικός, από κλινική άποψη, για τους εξής λόγους:

- § Η παρουσία ελεύθερων αντινισουλινικών αντισωμάτων στο πλάσμα επιδρά στον προσδιορισμό της ινσουλίνης με μεθόδους ανοσοπροσδιορισμού.
- § Σε πολύ υψηλούς τίτλους, τα αντινισουλινικά αντισώματα ενδέχεται να προκαλέσουν μια κατάσταση ανοχής στην ινσουλίνη.
- § Τα αντινισουλινικά αντισώματα ενδέχεται να επηρεάσουν την ποιότητα του γλυκαιμικού ελέγχου, σε διαβητικούς ασθενείς, επιμηκύνοντας την ημιζωή της ινσουλίνης.

B. Κλινικές εφαρμογές

- § Αξιολόγηση της παρουσίας ελεύθερων αντινισουλινικών αντισωμάτων πριν από τον προσδιορισμό των επιπέδων της ινσουλίνης, με ανοσοπροσδιορισμό, σε ασθενείς που υποβλήθηκαν πρόσφατα σε θεραπεία με ινσουλίνη.
- § Αξιολόγηση καταστάσεων ανοχής στην ινσουλίνη.
- § Επικουρικό μέσο στη διάγνωση λαθραίων εγχύσεων ινσουλίνης (τεχνητή υπογλυκαιμία, επαγόμενη από ινσουλίνη).
- § Παρακολούθηση της αξιολόγησης αντινισουλινικών αντισωμάτων, σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με τα πρόσφατα ανεπτυγμένα σκευάσματα ανθρώπινης ινσουλίνης (νέες περιπτώσεις, ασθενείς στους οποίους προηγούμενη θεραπεία με χοίρεια ή βόεια ινσουλίνη αντικαθίσταται από τη χορήγηση ανθρώπινης ινσουλίνης).

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η παρουσία κυκλοφορούντων αντινισουλινικών αντισωμάτων σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με ινσουλίνη υπολογίζεται σε ημι-ποσοτική βάση, μέσω προσδιορισμού της δέσμευσης της ¹²⁵I-Tyr-A14-ινσουλίνης στο κλάσμα του ορού που έχει υποστεί καθίζηση από την πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) (γάμμα σφαιρίνες).

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
Ag ¹²⁵I ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ σημασμένη με ¹²⁵I σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια ορολευκωματίνη, αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και θυμόλη	1 φιαλίδιο 1 ml 74 kBq	κόκκινο	Προσθέστε 10 ml απεσταγμένου νερού
CONTROL N Οροί ελέγχου - N = 1 έως 3 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη	3 φιαλίδια λυοφιλοποημένο	κίτρινο	Προσθέστε 1ml απεσταγμένου νερού
PEG PEG: Πολυαιθυλενογλυκόλη (16%) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια ορολευκωματίνη, Tween 20 και αζίδιο του νατρίου (0,5%)	1 φιαλίδιο 105 ml	πράσινο	Έτοιμο για χρήση

Αρνητικός ορός ελέγχου: Ο πρώτος ορός ελέγχου δεν περιέχει αντινισουλινικά αντισώματα. Επιτρέπει τον προσδιορισμό μη ειδικής δέσμευσης ιχνηθέτη. **Θετικοί οροί ελέγχου:** Οι δύο άλλοι οροί ελέγχου περιέχουν αντίστοιχα χαμηλά και υψηλά επίπεδα βόειων αντινισουλινικών αντισωμάτων.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:
- Απεσταγμένο νερό
 - Πιπέτες για διανομή: 100 μl και 1 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
 - Αναλώσιμα σωληνάρια από πολυστυρένιο (12 x 75 mm)
 - Πλαστικό φύλλο ή φύλλο αλουμινίου
 - Επωαστήρας στους 37° C
 - Αναμείκτης στροβιλισμού
 - Μαγνητικός αναδευτήρας
 - Συσκευή φυγοκέντρισης στα 1500 g
 - Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
 - Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης του ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Ιχνηθέτες:** Ανασυστήστε τον ιχνηθέτη με 10 ml απεσταγμένου νερού.
B. Οροί ελέγχου: Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 1 ml απεσταγμένου νερού.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, ο ιχνηθέτης και οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί επί 8 ημέρες στους 2-8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, θα πρέπει να δημιουργηθούν κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -20° C επί 3 μήνες το μέγιστο. Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού ή πλάσματος πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Μετά την απόψυξη, τα δείγματα πρέπει να αναμειγνύονται και να υποβάλλονται σε φυγοκέντριση.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείζτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση, μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

B. Διαδικασία

- Σημάνετε σωληνάρια από πολυστυρένιο εις διπλούν για κάθε ορό ελέγχου, δείγμα και τις μετρήσεις που αφορούν τον ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
- Αναμείζτε για λίγο (με αναμείκτη στροβιλισμού τύπου vortex) τους ορούς ελέγχου και τα δείγματα και διανείμετε 100 μl από έκαστο στα αντίστοιχα σωληνάρια.
- Διανείμετε 100 μl ινσουλίνης σημασμένης με ¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανοντας τα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total") .
- Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
- Καλύψτε τα σωληνάρια (με φύλλο πλαστικού ή αλουμινίου) και επώαστε επί 2 ώρες στους 37° C.
- Προσθέστε 1 ml από το διάλυμα PEG (σε θερμοκρασία δωματίου) σε κάθε σωληνάριο, εκτός από εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total"). Υποβάλετε σε σύντομο στροβιλισμό τα σωληνάρια.
- Επώαστε επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκεντρίστε για 15 λεπτά στις 1500 g. Δεν είναι απαραίτητη η χρήση συσκευής φυγοκέντρισης με σύστημα ψύξης αρκεί η θερμοκρασία να μη φθάσει τους 25° C.
- Αναρροφήστε αμέσως (ή μεταγγίστε) προσεκτικά τα υπερκείμενα από κάθε σωληνάριο (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"])). Προσέξτε να μη διαταράξετε το ίζημα.
- Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Υπολογίστε τη δεσμευμένη ραδιενέργεια ως ποσοστό των μετρήσεων που αφορούν τον ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total") σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$B/T(\%) = \frac{\text{Μετρήσεις (ΟΟράελέγχου ή δείγμα)}}{\text{Μετρήσεις ιχνηθέτη ("Total")}}$$

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί των τιμών πραγματικού χρόνου.

ΑΙΑ	cpm	B/T (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total")	33780	
Οροί ελέγχου: Αρνητικός ορός ελέγχου Θετικός ορός ελέγχου χαμηλής τιμής Θετικός ορός ελέγχου υψηλής τιμής	1265 6877 19435	3,7 20,4 57,5
Δείγμα 1 Δείγμα 2 Δείγμα 3	4054 7904 12363	12,0 23,4 36,3

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Ακρίβεια

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (B/T x 100)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (B/T x 100)	Σ.Δ. (%)
A	15	3,2 ± 0,4	12,5	A	38	3,5 ± 0,7	20
B	15	20,4 ± 0,6	2,9	B	38	20,8 ± 1,0	4,8
C	15	59,6 ± 1,0	1,6	C	38	60,0 ± 2,0	3,3

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. TIMEΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών. Ο προσδιορισμός εκτελέστηκε με 80 ορούς ασθενών, οι οποίοι δεν είχαν υποβληθεί ποτέ σε θεραπεία με ινσουλίνη. Το παρατηρηθέν ποσοστό δέσμευσης της ¹²⁵I-Tyr-A14- ανθρώπινης ινσουλίνης ήταν το ακόλουθο: 5,5% ± 0,9% (μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση). Κατά συνέπεια, μπορεί κανείς να θεωρήσει ότι ποσοστό δέσμευσης της ¹²⁵I-Tyr-A14- ανθρώπινης ινσουλίνης υψηλότερο από τη μέση τιμή + 3 τυπικές αποκλίσεις (8,2%) αντιστοιχεί στην παρουσία κυκλοφορούντων αντιινσουλινικών αντισωμάτων.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλειας
Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.
Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV). Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.
Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων. Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία. Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.
Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.
Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίζει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσώρευσης αζιδίου.
Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ASLIN C.M., HARTOG M. and GOLDIE D.J. (1978)
The relationship between circulating free and bound insulin, insulin antibodies, insulin dosage and diabetic control in insulin treated diabetics.
Acta Endocrinologica 87, 330-338.

2. BAXTER R.C., YVE D.K. and TURTLE T.R. (1976)
Equilibrium binding studies of insulin antibodies in diabetic subjects.
Clin. Chem. 2217, 1089-1094.

3. DECKERT T. and GRUNDALL E. (1970)
The antigenicity of pig insulin.
Diabetologia 6,15-20.

4. DESBUQUOIS B. and AURBACH G.D. (1971)
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptides hormones in radioimmunoassays.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 732-38.

5. DIXON K. (1974)
Measurement of antibodies to insulin in serum.
Clin. Chem. 20/10, 1275-1281.

6. DIXON K., EXON P.D. and MALINS H. (1975)
Insulin antibodies and the control of diabetes.
Quarterly Journal of Medicine, New Series, XLIV, n° 176, 543-53.

7. WALDHAUSL, W.K., BRATUSCH-MARRAIN P., KRUSE V., JENSEN Y., NOWOTNY Y. and VIERHAPPER H. (1985)
Effect of insulin antibodies on insulin pharmacokinetics and glucose utilization in insulin-dependent diabetic patients.
Diabetes 34: 166-173.

8. CHRISTIANSEN A.H. (1973)
Radioimmuno-electrophoresis in the determination of insulin binding to IgG. Methodological studies.
Horm. Metab. Res. 5: 147-154.

9. FALHOLT K., HOSKAM J.A.M., KARAMANOS B.G., SUSSTRUNK H., VISWANATHAN M. and HEDING L.G. (1983)
Insulin-specific IgE in serum of 67 diabetic patients against human insulin (NOVO), porcine insulin, and bovine insulin. Four cases reports.
Diabetes care 6: 61-65.

10. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S. and GOLDMAN J. (1983)
Effects of species of origin, purification levels and formulation on insulin immunogenicity.
Diabetes 32:592-599.

11. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S., RATHBUN M.J. and HUFFERD S. (1983)
Immunogenicity of recombinant DNA human insulin.
Diabetologica 25: 465-469.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total") μl	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ μl
Δείγματα, οροί ελέγχου Ιχνηθέτης	- 100	100 100
Επώαση	2 ώρες στους 37° C	
PEG	-	1000
Επώαση Φυγοκέντριση Διαχωρισμός	15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου 15 λεπτά στα 1500 g Αναρροφήστε το υπερκείμενο	
Μέτρηση	Μετρήστε τα σωληνάρια για 60 δευτερόλεπτα	

Αρ. καταλόγου DIASource: KIP0091	Αριθμός P.I.: 1700439/el	Αρ. αναθεώρησης: 100813/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------



Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

AIA-100

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunoenzymatyczne do ilościowego pomiaru ludzkich wolnych przeciwciał antyinsulinowych (anti-insulin antibodies (AIA)) w surowicy i w osoczu metodą *in vitro*.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa firmowa: DIAsource AIA-100
- B. Numer katalogowy: KIP0091 : 100 oznaczeń
- C. Wyprodukowano przez: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel.: +32 (0)67 88.99.99

Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

Występowanie przeciwciał antyinsulinowych (AIA) u chorych na cukrzycę leczoną insuliną zaobserwowano już w 1955 roku. Obecnie dostępne preparaty insuliny wysokooczyszczonej są mniej immunogenne, niż niektóre z preparatów wcześniej stosowanych i słabiej oczyszczonych. Insulina bydłęca jest bardziej immunogenna od hormonu wieprzowego. Ostatnio zaobserwowano, że przeciwciała AIA mogą pojawić się u pacjentów leczonych insuliną ludzką.

Oznaczenie przeciwciał antyinsulinowych we krwi krążącej ma znaczenie w następujących sytuacjach klinicznych:

- § Występowanie wolnych przeciwciał antyinsulinowych w osoczu może zaburzyć przebieg oznaczenia insuliny metodami radioimmunoenzymatycznymi.
- § W bardzo wysokich mianach przeciwciała antyinsulinowe mogą indukować stan insulinooporności.
- § Przeciwciała antyinsulinowe, poprzez wydłużanie czasu półtrwania insuliny, mogą ograniczać jakość kontroli glikemii u pacjentów chorych na cukrzycę.

B. Zastosowania kliniczne

- § Określenie występowania wolnych przeciwciał antyinsulinowych przed oznaczeniem poziomów insuliny metodami radioimmunoenzymatycznymi u pacjentów wcześniej leczonych insuliną;
- § Określenie stanów insulinooporności;
- § Pomoc w rozpoznawaniu dodatkowych, nieujawnionych wstrzykiwań insuliny w stanach hipoglikemii poinsulinowej;
- § Monitorowanie występowania przeciwciał antyinsulinowych u pacjentów przyjmujących nowe preparaty insuliny ludzkiej (nowe przypadki; pacjenci u których wcześniej stosowane leczenie insulinami zwierzęcymi jest zastępowane preparatami insuliny ludzkiej).

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZYCE METODY

Występowanie przeciwciał antyinsulinowych w krwi krążącej u chorych na cukrzycę, leczonych insuliną, jest oznaczane metodą półilościową, poprzez określanie stopnia wiązania ¹²⁵I-Tyr-A14-insuliny do frakcji gammaglobulin w surowicy, wytrączanych za pomocą glikolu polietylenowego (PEG).

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
Ag^{125I} ZNACZNIK IZOTOPOWY: INSULINA znakowana jodem ¹²⁵I w buforze fosforanowym z albuminą surowicy bydlęcej, thymolem i azydkiem sodowym (<0,1%)	1 fiolka 1 ml 74 kBq	czerwony	Dodać 10 ml wody destylowanej
CONTROLN Kontrolne - N = od 1 do 3 (dokładne wartości znajdują się na etykietach fiolek) w surowicy ludzkiej z thymolem	3 fiolki materiał liofilizowan y	srebrny	Dodać 1 ml wody destylowanej
PEG PEG: Glikol polietylenowy (16%) w buforze fosforanowym z bydlęcą albuminą surowiczą, Tween 20 i azydkiem sodowym (0,5%)	1 fiolka 105 ml	zielony	Gotowy do zastosowania.

Kontrola ujemna: Pierwsza próbka kontrolna nie zawiera żadnych przeciwciał antyinsulinowych. Pozwala na oznaczenie nieswoistych, znacznikowych substancji wiążących.

Kontrolne dodatnie: Dwie pozostałe próbki kontrolne zawierają (odpowiednio) niskie i wysokie poziomy wolnych, bydlęcych przeciwciał antyinsulinowych.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

- Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:
- Woda destylowana
 - Pipety do dozowania: 100 µl i 1 ml (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
 - Jednorazowe próbówki polistyrenowe (12 x 75 mm)
 - Folia plastikowa lub aluminiowa
 - Inkubator 37°C
 - Mieszadło wirowe
 - Mieszadło magnetyczne
 - Wirówka 1500 g
 - Układ do aspiracji (opcjonalnie)
 - Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ¹²⁵I (minimalny uzysk 70%)

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Znaczniki:** Rozpuścić znacznik przy pomocy 10 ml wody destylowanej.
- B. Kontrolne:** Kontrolne należy rekonstruować przy pomocy 1 ml wody destylowanej.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rekonstytucji, kalibratory i kontrolne zachowują trwałość przez 8 dni, pod warunkiem przechowywania w temperaturze od 2 do 8°C. W razie konieczności przechowywania przez dłuższy okres czasu, należy przygotować niewielkie objętości kontroli, co pozwala przechowywać je w temperaturze -20 °C przez 3 miesiące. Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy lub osocza muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.
- Po rozmrożeniu próbki powinny być wymieszane i odwirowane.

X. PROCEDURA

- A. Uwagi dotyczące obsługi**
- Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności.
- Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów.
- Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.
- Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie.
- Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia.
- Przestrzegać czasów inkubacji.
- Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.
- B. Procedura**
- Podwojnie oznaczyć próbówki polistyrenowe dla każdej próbki kontrolnej, badanej i do całkowitego zliczania.
 - Krótko wirować próbki kontrolne i badane a następnie dozować po 100 µl każdej substancji do odpowiednich próbek.
 - Dozować po 100 µl insuliny znakowanej jodem ¹²⁵I do każdej próbówki, w tym do próbek całkowitego zliczania.
 - Delikatnie potrząsnąć statywem w celu uwolnienia uwięzionych pęcherzyków powietrza.
 - Przykryć próbówki (folią plastikową lub aluminiową) a następnie inkubować przez 2 godziny w temperaturze 37°C.
 - Dodać po 1 ml roztworu PEG (w temperaturze pokojowej) do każdej próbówki z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania. Krótko wirować próbówki.
 - Inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej.
 - Wirować przez 15 minut przy 1500 g. Stosowanie wirówek chłodzonych nie jest konieczne - wystarczy upewnić się, że temperatura nie wzrośnie powyżej 25 °C.
 - Natychmiast ostrożnie aspirować (lub osuszyć) supernatanty z każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). Należy uważać, aby nie naruszyć osadu.
 - Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

- Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
- Obliczyć radioaktywność związaną jako odsetek zliczeń całkowitych, według następującego wzoru:

$$B/T (\%) = \frac{\text{Liczba zliczeń (Próbki kontrolnej lub badanej)}}{\text{Liczba zliczeń całkowitych}} \times 100$$

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

AIA	cpm	B/T (%)
Zliczanie całkowite	33780	
Kontrolne:		
Kontrola ujemna	1265	3,7
Kontrola dodatnia, poziom niski:	6877	20,4
Kontrola dodatnia, poziom wysoki:	19435	57,5
Próbka 1	4054	12,0
Próbka 2	7904	23,4
Próbka 3	12363	36,3

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Precyzja

PRECYZJA W SERII				PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI			
Surowica	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (B/T x 100)	CV (%)
A	15	3,2 ± 0,4	12,5	A	38	3,5 ± 0,7	20
B	15	20,4 ± 0,6	2,9	B	38	20,8 ± 1,0	4,8
C	15	59,6 ± 1,0	1,6	C	38	60,0 ± 2,0	3,3

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych, każde laboratorium powinno opracować własne wartości referencyjne. Przeprowadzono badanie 80 surowic pacjentów, którzy nigdy nie przyjmowali insuliny. Obserwowano następujący odsetek wiązania ¹²⁵I-Tyr-A14-insuliny ludzkiej: 5,5 % ± 0,9 % (wartość średnia ± 1 odchylenie standardowe). Dlatego można uznać, że wyższy odsetek wiązania ¹²⁵I-Tyr-A14-insuliny ludzkiej od wartości średniej + 3 odchylenia standardowe (8,2%) odpowiada występowaniu krążących przeciwciał antyinsulinowych.

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.
Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35.5 keV).
Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.
Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.
Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewni wystarczające zabezpieczenie.
Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.
Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.
Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.
Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. ASLIN C.M., HARTOG M. and GOLDIE D.J. (1978)
The relationship between circulating free and bound insulin, insulin antibodies, insulin dosage and diabetic control in insulin treated diabetics.
Acta Endocrinologica 87, 330-338.
2. BAXTER R.C., YVE D.K. and TURTLE T.R. (1976)
Equilibrium binding studies of insulin antibodies in diabetic subjects.
Clin. Chem. 2217, 1089-1094.
3. DECKERT T. and GRUNDALL E. (1970)
The antigenicity of pig insulin.
Diabetologia 6,15-20.
4. DESBUQUOIS B. and AURBACH G.D. (1971)
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptides hormones in radioimmunoassays.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 732-38.
5. DIXON K. (1974)
Measurement of antibodies to insulin in serum.
Clin. Chem. 20/10, 1275-1281.
6. DIXON K., EXON P.D. and MALINS H. (1975)
Insulin antibodies and the control of diabetes.
Quarterly Journal of Medicine, New Series, XLIV, n° 176, 543-53.
7. WALDHAUSL, W.K., BRATUSCH-MARRAIN P., KRUSE V., JENSEN Y., NOWOTNY Y. and VIERHAPPER H. (1985)
Effect of insulin antibodies on insulin pharmacokinetics and glucose utilization in insulin-dependent diabetic patients.
Diabetes 34: 166-173.
8. CHRISTIANSEN A.H. (1973)
Radioimmuno-electrophoresis in the determination of insulin binding to IgG. Methodological studies.
Horm. Metab. Res. 5: 147-154.
9. FALHOLT K., HOSKAM J.A.M., KARAMANOS B.G., SUSSTRUNK H., VISWANATHAN M. and HEDING L.G. (1983)
Insulin-specific IgE in serum of 67 diabetic patients against human insulin (NOVO), porcine insulin, and bovine insulin. Four cases reports.
Diabetes care 6: 61-65.
10. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S. and GOLDMAN J. (1983)
Effects of species of origin, purification levels and formulation on insulin immunogenicity.
Diabetes 32:592-599.
11. FINEBERG S.E., GALLOWAY J.A., FINEBERG N.S., RATHBUN M.J. and HUFFERD S. (1983)
Immunogenicity of recombinant DNA human insulin.
Diabetologica 25: 465-469.

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ µl	PRÓBKIE KONTROLE µl
Próbki, kontrole Znacznik izotopowy	- 100	100 100
Inkubacja	2 godziny w temperaturze 37°C	
PEG	-	1000
Inkubacja Wirowanie Rozdzielenie	15 minut w temperaturze pokojowej 15 minut przy 1500 g Aspirowanie supernatantów	
Zliczanie	Zliczanie próbek przez 60 sekund	

Nr katalogowy DIAsource KIP0091	Numer P.I. 1700439/pl	Nr aktualizacji : 100813/1
------------------------------------	--------------------------	-------------------------------

	<u>Used symbols</u>	<u>Symboles utilisés</u>
	Consult instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation
	Storage temperature	Température de conservation
	Use by	Utiliser jusque
	Batch code	Numéro de lot
	Catalogue number	Référence de catalogue
	Control	Contrôle
	In vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Manufacturer	Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests
	Wash solution concentrated	Solution de lavage concentrée
	Zero calibrator	Calibrateur zéro
	Calibrator #	Calibrateur #
	Control #	Contrôle #
	Tracer	Traceur
	Tracer	Traceur
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tubes	Tubes
	Incubation buffer	Tampon d'incubation
	Acetonitrile	Acétonitrile
	Serum	Sérum
	Specimen diluent	Diluant du spécimen
	Dilution buffer	Tampon de dilution
	Antiserum	Antisérum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbant
	Calibrator diluent	Diluant de calibrateur
	Reconstitution solution	Solution de reconstitution
	Polyethylene glycol	Glycol Polyéthylène
	Extraction solution	Solution d'extraction
	Elution solution	Solution d'élution
	Bond Elut Silica cartridges	Cartouches Bond Elut Silica
	Pre-treatment solution	Solution de pré-traitement
	Neutralization solution	Solution de neutralisation
	Tracer buffer	Tampon traceur
	Microtiterplate	Microplaque de titration
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	Conjugate buffer	Tampon conjugué
	Chromogenic TMB concentrate	Chromogène TMB concentré
	Chromogenic TMB solution	Solution chromogène TMB
	Substrate buffer	Tampon substrat
	Stop solution	Solution d'arrêt
	Incubation serum	Sérum d'incubation
	Buffer	Tampon
	AP Conjugate	AP Conjugué
	Substrate PNPP	Tampon PNPP
	Biotin conjugate concentrate	Biotine conjugué concentré
	Avidine HRP concentrate	Avidine HRP concentré
	Assay buffer	Tampon de test
	Biotin conjugate	Biotine conjugué
	Specific Antibody	Anticorps spécifique
	Streptavidin HRP concentrate	Concentré streptavidine HRP
	Non-specific binding	Liant non spécifique
	2nd Antibody	Second anticorps
	Acidification Buffer	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Gebrauchsanweisung beachten
	Bewaartemperatuur	Lagern bei
	Houdbaar tot	Verwendbar bis
	Lotnummer	Chargenbezeichnung
	Catalogusnummer	Bestellnummer
	Controle	Kontrolle
	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek	In Vitro Diagnostikum
	Fabrikant	Hersteller
	Inhoud voldoende voor <n> testen	Ausreichend für <n> Ansätze
	Wasoplossing, geconcentreerd	Waschlösung-Konzentrat
	Nulkalibrator	Null kalibrator
	Kalibrator #	Kalibrator #
	Controle #	Kontrolle #
	Tracer	Tracer
	Tracer	Tracer
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Buisjes	Röhrchen
	Incubatiebuffer	Inkubationspuffer
	Acetonitrile	Azetonitril
	Serum	Humanserum
	Specimen diluent	Probenverdünner
	Verdunningsbuffer	Verdünnungspuffer
	Antiserum	Antiserum
	Immunoabsorbent	Immunadsorbens
	Kalibratorverdunner	Kalibratorverdünnung
	Reconstitutieoplossing	Rekonstitutionslösung
	Polyethyleen glycol	Polyethylenglykol
	Extractieoplossing	Extraktionslösung
	Elutieoplossing	Eluierungslösung
	Bond Elut Silica kolom	Bond Elut Silikakartuschen
	Pre-behandelingsoplossing	Vorbehandlungslösung
	Neutralisatieoplossing	Neutralisierungslösung
	Tracerbuffer	Tracer-Puffer
	Microtiterplaat	Mikrotiterplatte
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjuaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjuaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substrat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat
	Specifiek antilichaam	Spezifischer Antikörper
	Streptavidine-HRP concentraat	HRP Streptavidinkonzentrat
	Aspecifieke binding	Unspezifische Bindung
	2de antilichaam	Sekundärer Antikörper
	Verzuringbuffer	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso	Consultar las instrucciones de uso
	Limitazioni di temperatura	Limitación de temperatura
	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Numero di lotto	Código de lote
	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Controllo	Control
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabbricante	Fabricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Tampone di lavaggio concentrato	Solución de lavado concentrada
	Calibratore zero	Calibrador cero
	Standard #	Calibrador #
	Controllo #	Control #
	Marcato	Trazador
	Marcato	Trazador
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Provette	Tubos
	Tampone incubazione	Tampón de incubación
	Acetonitrile	Acetonitrilo
	Siero	Suero
	Diluente campione	Diluyente de Muestra
	Tampone diluizione	Tampón de dilución
	Antisiero	Antisuero
	Immunoassorbente	Inmunoadsorbente
	Diluente calibratore	Diluyente de calibrador
	Soluzione di ricostituzione	Solución de Reconstitución
	Polietilenglicole	Glicol Polietileno
	Soluzione di estrazione	Solución de extracción
	Soluzione di eluizione	Solución de elución
	Cartucce di silice bond elut	Cartuchos Bond Elut Silica
	Soluzione di pretrattamento	Solución de Pre-tratamiento
	Soluzione di neutralizzazione	Solución de Neutralización
	Tracer Buffer	Tampón de trazador
	Piastra di microtitolazione	Placa de microvaloración
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	Buffer coniugato	Tampón de Conjugado
	Cromogena TMB concentrato	Cromógena TMB concentrada
	Soluzione cromogena TMB	Solución Cromógena TMB
	Tampone substrato	Tampón de sustrato
	Soluzione di arresto	Solución de Parada
	Incubazione con siero	Suero de Incubación
	Buffer	Tampón
	AP Coniugato	AP Conjugado
	Substrato PNPP	Sustrato PNPP
	Concentrato coniugato con biotina	Concentrado de conjugado de biotina
	Concentrato avidina HRP	Concentrado avidina-HRP
	Soluzione tampone per test	Tampón de ensayo
	Coniugato con biotina	Conjugado de biotina
	Anticorpo Specifico	Anticuerpo específico
	Streptavidina-HRP concentrata	Estreptavidina-HRP Concentrado
	Legame non-specifico	Unión no específica
	2° Anticorpo	Segundo anticuerpo
	Tampone Acidificante	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>	<u>Använda symboler</u>
	Consulte instruções de utilização	Läs instruktionerna före användning
	Temperatura de conservação	Förvaringstemperatur
	Utilizar antes de	Används av
	Código de lote	Lotnummer
	Número de catálogo	Katalognummer
	Controlo	Kontroll
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	In vitro diagnostiskt kit
	Fabricante	Tillverkare
	Conteúdo suficiente para <n> testes	Innehållet räcker till <n> prover
	Solução de lavagem concentrada	Tvättlösning, koncentrerad
	Calibrador zero	Nollkalibrerare
	Calibrador #	Kalibrator #
	Controlo #	Kontroll #
	Marcador	Radioisotop, antigen
	Marcador	Radioisotop, antikropp
	Marcador concentrada	Radioisotop, antigen koncentrerad
	Marcador concentrada	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Tubos	Rör
	Tampão de incubação	Inkuberingsbuffert
	Acetonitrilo	Acetonitril
	Soro	Serum
	Diluidor de espécimes	Spädningsbuffert för prover
	Tampão de diluição	Spädningsbuffert
	Anti-soro	Antiserum
	Imunoadsorvente	Immunoadsorberare
	Diluyente do calibrador	Kalibratordiluent
	Solução de Reconstituição	Rekonstitutionslösning
	Polietileno-glicol	Polyetylen glykol
	Solução de Extração	Extraktionslösning
	Solução de Eluição	Elueringslösning
	Cartuchos de sílica Bond Elut	Silikonpatroner för elueringsbindning
	Solução de pré-tratamento	Förbehandlingslösning
	Solução de neutralização	Neutraliseringslösning
	Tampão Marcador	Tracerbuffert
	Placa de micro titulação	Microtiterplatta
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	Conjuge o tampão	Konjugatbuffert
	Cromogénica TMB concentrada	Kromogeniskt TMB-koncentrat
	Solução Cromogénica TMB	Kromogenisk TMB-lösning
	Tampão de substrato	Substratbuffert
	Solução de Paragem	Stopplösning
	Soro de incubação	Inkubationsserum
	Tampão	Buffert
	AP Conjugação	AP-konjugat
	Substrato PNPP	Substrat-PNPP
	Concentrado conjugado de biotina	Biotinkonjugat koncentrat
	Concentrado HRP de avidina	Avidin HRP-koncentrat
	Tampão de ensaio	Provbuffert
	Conjugado de biotina	Biotinkonjugat
	Anticorpo específico	-
	Estreptavidina HRP concentrado	-
	Ligações não específicas	-
	Anticorpo secundário	-
	Tampão de acidificação	-

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>	<u>Anvendte symboler</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Læs brugsvejledningen
	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Opbevaringstemperatur
	Ημερομηνία λήξης	Anvend inden
	Αριθμός παρτίδας	Batchkode
	Αριθμός καταλόγου	Katalognummer
	Πρότυπο ελέγχου	Kontrol
	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Κατασκευαστής	Fabrikant
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις	Indeholder nok til <n> test
	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης	Koncentreret vaskeopløsning
	Μηδενικός βαθμονομητής	Nul-kalibrator
	Βαθμονομητής #	Kalibrator nr.
	Ορός ελέγχου #	Kontrol nr.
	Ιχνηθέτης	Markør
	Ιχνηθέτης	Markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Σωληνάριο	Tuber
	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	Inkubationsbuffer
	Ακετονιτρίλιο	Acetonitril
	Ορός	Serum
	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων	Prøvediluent
	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Fortyndingsbuffer
	Αντιορός	Antiserum
	Ανοσοπροσροφητικό	Immonoadsorbent
	Αραιωτικό βαθμονομητών	Kalibratordiluent
	Διάλυμα ανασύστασης	Rekonstitueringsopløsning
	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Polyetylenglykol
	Διάλυμα εκχύλισης	Ekstraktionsopløsning
	Διάλυμα έκλουσης	Elueringsopløsning
	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	Patroner med bindingselueringssilica
	Διάλυμα προεπεξεργασίας	Forbehandlingsopløsning
	Διάλυμα εξουδετέρωσης	Neutraliseringsopløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Markørbuffer
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Mikrotiterplade
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Konjugatbuffer
	Χρωμογόνος TMB	Kromogen TMB-koncentreret
	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	Kromogen TMB-opløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	Substratbuffer
	Ανασχετικό αντιδραστήριο	Stopopløsning
	Ορός επώασης	Inkubationsserum
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
	AP Σύζευγμα	AP-konjugat
	PNPP υποστρώματος	Substrat PNPP
	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat koncentrat
	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP	Avidin HRP koncentrat
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	Prøvebuffer
	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat
	Ειδικό Αντίσωμα	-
	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP	-
	μη-ειδική δέσμευση	-
	2ο Αντίσωμα	-
	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	-

	<u>Stosowane symbole</u>	<u>Használt szimbólumok</u>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją	Olvassa el a használati útmutatót
	Temperatura przechowywania	Tárolási hőmérséklet
	Zużyć przed	Lejáratí idő
	Kod serii	Gyártási kód
	Numer katalogowy	Katalógus szám
	Kontrola	Kontrol
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz
	Producent	Gyártó
	Zawartość wystarczająca do <n> testów	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
	Roztwór płuczący stężony	Mosó folyadék koncentrátum
	Kalibrator zerowy	Zero kalibrátor
	Kalibrator nr	Kalibrátor #
	Kontrola nr	Kontrol #
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Probówki	Csővek
	Wymagana inkubacja buforu	Inkubáló puffer
	Acetonitryl	Acetonitril
	Surowica	Szérum
	Rozcieńczalnik próbki	Mintahígító
	Bufor do rozcieńczania	Hígító puffer
	Antysurowica	Antiszérum
	Immunoabsorbent	Immunadszorbens
	Rozcieńczalnik kalibratora	Kalibrátor hígító
	Roztwór do rozcieńczania	Mintaelőkészítő oldat
	Glikol poli(oksy)etylenowy	Polietilén glikol
	Roztwór ekstrakcyjny	Extrakciós oldat
	Roztwór elucyjny	Eluáló oldat
	Kolumny krzemionkowe Bond Elut	Bond Elut Silica szilikagél patronok
	Roztwór do przygotowania wstępnego	Előkezelő oldat
	Roztwór neutralizujący	Semlegesítő oldat
	Bufor znacznika	Nyomjelző izotóp hígító puffer
	mikro płytki	Mikrotiter lemez
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Bufor do koniugacji	Konjugátum puffer
	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB oldat
	Bufor substratu	Szubsztrát puffer
	Roztwór zatrzymujący reakcję	Stop oldat
	Wymagana inkubacja surowicy	Inkubációs szérum
	Bufor	Puffer
	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)	AP konjugátum
	p-nitrofenylofosforan substratowy	Szubsztrát PNPP
	Koncentrat koniugatu biotyny	Biotin konjugátum koncentrátum
	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną	Avidin HRP koncentrátum
	Bufor do oznaczania	Vizsgálati puffer
	Koniugatu biotyny	Biotin konjugátum
	Przeciwciało swoiste	Specifikus ellenanyag
	Koncentrat streptawidyny HRP	Sztreptawidin HRP koncentrátum
	Wiązanie nieswoiste	Nem-specifikus kötődés
	Drugie przeciwciało	Másodlagos ellenanyag
	Bufor zakwaszający	Savas puffer

	<u>Използвани символи</u>
	Вижте инструкцията за работа
	Температура на съхранение
	Използвайте с
LOT	Партиден код
REF	Каталожен номер
CONTROL	Контрол
IVD	Ин витро диагностично медицинско изделие
	Производител
	Съдържание достатъчно за <n> теста
WASH SOLN CONC	Концентриран измиващ разтвор
CAL 0	Нулев калибратор
CAL N	Калибратор #
CONTROL N	Контрол #
Ag 125I	Трейсър
Ab 125I	Трейсър
Ag 125I CONC	Концентриран маркер
Ab 125I CONC	Концентриран маркер
	Епруветки
INC BUF	Инкубационен буфер
ACETONITRILE	Ацетонитрил
SERUM	Серум
DIL SPE	Разредител за пробите
DIL BUF	Буфер за разреждане
ANTISERUM	Антисерум
IMMUNOABSORBENT	Имуноабсорбент
DIL CAL	Разредител за калибратора
REC SOLN	Пресъздаващ разтвор
PEG	Полиетилен гликол
EXTR SOLN	Екстрактов разтвор
ELU SOLN	Разтвор за елюиране
GEL	Силикагелни пълнители
PRE SOLN	Пред-лечебен разтвор
NEUTR SOLN	Неутрализиращ разтвор
TRACEUR BUF	Маркерен буфер
	Микротитърна пластина
Ab HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ag HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ab HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
Ag HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
CONJ BUF	Буфер за конюгата
CHROM TMB CONC	Хромогенен ТМВ концентрат
CHROM TMB	Хромогенен ТМВ разтвор
SUB BUF	Субстратен буфер
STOP SOLN	Стоп разтвор
INC SER	Инкубационен серум
BUF	Буфер
Ab AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза
SUB PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат
BIOT CONJ CONC	Биотин конюгиран концентрат
AVID HRP CONC	Авидин HRP концентрат
ASS BUF	Буфер за пробите
Ab BIOT	Биотин конюгат
Ab	специфично антитяло
SAV HRP CONC	стрептавидин HRP концентрат
NSB	не специфично свързване
2nd Ab	второ антитяло
ACID BUF	киселинизиращ буфер