



Návod k použití

Platí od 07.03.2023

CentAK® IAA M

REF 2035

Radioimunoanalýza pro stanovení
protilátek proti inzulinu (IAA)
v lidském séru



Medipan GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow OT Dahlewitz
Německo
Telefon: +49 33708 4417 0
Fax: +49 33708 4417 25
info@medipan.de
www.medipan.de



1 Účel použití

CentAK® IAA M je kvantitativní imunoanalýza pro stanovení protilátek proti inzulinu (IAA) v lidském séru.

CentAK® IAA M je určen jako pomůcka při diagnostice autoimunitního diabetes mellitus 1. typu ve spojení s dalšími klinickými a laboratorními nálezy.

Imunoanalýza je určena pro manuální profesionální diagnostické použití *in vitro*.

2 Diagnostický význam

Diabetes mellitus 1. typu je chronické autoimunitní onemocnění, při kterém jsou zničeny beta buňky Langerhansových ostrůvků slinivky břišní produkující inzulin. Důsledkem této destrukce je snížená produkce inzulinu, která se nakonec projeví jak diabetes mellitus s vysokou hladinou krevního cukru v krvi. Genetické predispozice a virové infekce jsou považovány za rizikové faktory, přesné příčiny však dosud nebyly zcela objasněny.

Destrukce beta buněk pankreatu produkujících inzulin je založena na přítomnosti protilátek buněk ostrůvků (ICA), které jsou namířeny proti různým antigenům buněk pankreatických ostrůvků, jako je dekarboxyláza kyseliny glutamové (GAD65), tyrozinofosfatáza ICA 512 (IA2), zinkový transportér 8 (ZnT8) a proti inzulinu. Protilátky ostrůvkových buněk (ICA) lze prokázat u 70 – 80 % pacientů s diabetes mellitus. Různé protilátky se obvykle objevují měsíce až roky před výskytem zvýšených hladin krevního cukru, a jsou proto také považovány za důležité prognostické markery pro identifikaci pacientů se zvýšeným rizikem rozvoje diabetes mellitus 1. typu. Kombinovaná detekce protilátek proti GAD65, IA2, ZnT8 a inzulinu je považována za důležitou metodu pro diagnostiku diabetes mellitus 1. typu na počátku onemocnění.

Výskyt protilátek proti inzulinu (IAA) je známkou progresivní destrukce pankreatických beta buněk u pacientů s diabetes mellitus 1. typu. Jejich prevalence je zvláště zvýšená u dětí a dospívajících s diabetes mellitus 1. typu, kteří dosud nebyli léčeni inzulinem.

3 Princip testu

Radioimunoanalýzy se široce používají pro stanovení specifických protilátek. K tomuto účelu se používají stopovací molekuly složené z antigenů konjugovaných s radioaktivními složkami, které detekují specifické protilátky ve vzorku pacienta. Protein A váže protilátky ze vzorku a umožňuje jednoduchou separaci aglutinovaných imunitních komplexů z reakční směsi centrifugací. Radioaktivita precipitátu se měří a je úměrná aktivitě protilátek ve vzorku.

4 Komponenty testu

Komponenta	Popis
Kalibrátor 1 - 4 CAL 4 x 0,5 ml	Ředěné lidské sérum (připravené k použití; obsahuje azid sodný) Aktivity protilátek jsou uvedeny v certifikátu kontroly kvality.
Kalibrátor 00 CAL 1 x 0,5 ml	Ředěné lidské sérum (připraveno k použití; obsahuje azid sodný)
Nízká kontrola CI CONTROL 1 x 0,5 ml	Ředěné lidské sérum (připraveno k použití; obsahuje azid sodný) Aktivita protilátek je uvedena v certifikátu kontroly kvality.
Vysoká kontrola CII CONTROL 1 x 0,5 ml	Ředěné lidské sérum (připraveno k použití; obsahuje azid sodný) Aktivita protilátek je uvedena v certifikátu kontroly kvality.
Tracer D TRAC 2 x 1,5 ml	 Lidský inzulin konjugovaný s jódem-125 (< 34 kBq, t _{1/2} = 59 dní; záření gama 35 keV, záření x 27 keV, 31 keV; (připraveno k použití; obsahuje azid sodný))
Rekonstituční pufr H RBU 1 x 6 ml	Roztok (připravený k použití; obsahuje azid sodný)
Srážecí pufr J PBU 1 x 105 ml	Roztok (připravený k použití; obsahuje azid sodný)
Protein A L PA 2 lyofilizáty	Suspenze proteinu A (lyofilizovaná; obsahuje azid sodný)
Certifikát QC 1 kus	-
Návod k použití 1 kus	-

5 Požadované materiály, které nejsou poskytovány

- Běžné laboratorní vybavení
- Přesné pipety (5 - 1000 µl) a jednorázové špičky
- Kuželové zkumavky a stojany na vzorky
- Vortexový mixér nebo jiné rotátory
- Odstředivka
- Gama počítač
- Absorpční papír nebo papírový ubrousek
- Destilovaná nebo deionizovaná voda

6 Skladování a stabilita

Po obdržení musí být všechny testovací komponenty skladovány při teplotě 2 °C až 8 °C, nejlépe v původní krabici soupravy. Při správném skladování v původních obalech jsou všechny složky stabilní až do data expirace.

7 Obecné informace

Tento produkt je určen pouze pro diagnostiku *in vitro*. Před použitím je třeba si pečlivě přečíst návod k použití. Platí pouze pro tento výrobek s uvedeným složením a musí být přísně dodržován, aby byly zajištěny spolehlivé výsledky testů. Odchytky mohou vést k chybným výsledkům testu. Složky se nesmí zaměňovat za testovací činidla různých šarží nebo jiných výrobců.

Při odebrání alikvotů z lahvíček je třeba zabránit kontaminaci činidel použitím aseptických technik. Po použití musí být lahvíčky s činidly pevně uzavřeny příslušnými uzávěry.

Křížová kontaminace vzorků nebo činidel může vést k nekonzistentním výsledkům testů a je třeba jí zabránit používáním důsledných pipetovacích technik.

8 Příprava

8.1 Příprava činidel

Všechny složky je třeba před použitím uvést na pokojovou teplotu (RT: 18 °C až 25 °C) po dobu nejméně 30 minut; s výjimkou srážecího pufru, který je třeba až do použití uchovávat při teplotě 2 °C až 8 °C. Všechny tekuté složky se musí jemně promíchat, aby byla zajištěna homogenita.

8.1.1 Kalibrátory

Kalibrátory jsou připraveny k použití a nesmí se dále ředit. Kalibrátory se musí použít při každé zkoušce. CAL 0 by měl mít hodnotu 0,04 U/ml.

8.1.2 Kontroly

Kontroly jsou připraveny k použití a nesmí se dále ředit. Kontroly musí být použity v každé zkoušce. Laboratoře mohou také validovat své vlastní kontrolní vzorky a používat je alternativně.

8.1.3 Rekonstituční pufr

Rekonstituční pufr je připraven k použití a slouží k rekonstituci proteinu A.

8.1.4 Tracer

Tracer je připraven k použití a nesmí se dále ředit.

8.1.5 Protein A

Protein A je lyofilizovaný a musí být rekonstituován s 2,6 ml rekonstitučního pufru na lahvíčku. Rekonstituovaný roztok proteinu A zůstává stabilní po dobu 2 týdnů při skladování při teplotě 2 °C až 8 °C.

8.1.6 Srážecí pufr

Srážecí pufr je připraven k použití a musí být až do použití skladován při teplotě 2 °C až 8 °C.

8.2 Příprava vzorků

8.2.1 Materiál vzorků

Doporučuje se použít čerstvé sérum odebrané z krve venepunkcí. Je třeba se vyhnout použití ikerických, lipemických, hemolytických nebo bakteriálně kontaminovaných vzorků. Nerozpustné látky musí být ze vzorku odstraněny odstředěním. Vzorky nesmí být tepelně inaktivovány.

8.2.2 Skladování vzorků

Vzorky lze uchovávat při teplotě 2 °C až 8 °C až tři dny. Dlouhodobé skladování vyžaduje teplotu -20 °C. Je třeba se vyhnout opakovanému zmrazování a rozmrazování. Pro opakované použití by měly být vzorky alikvotovány a uchovávány při -20 °C.

9 Provedení testu

9.1 Postup

Pro zpracování radioimunoanalýzy se doporučují kónické zkušavky na vzorky. Musí být připraveno dostatečné množství zkušavek pro kalibrátory, kontroly a vzorky, včetně další zkušavky pro analýzu izolované stopové látky jako reference. Musí být dodrženy uvedené inkubační doby a teploty a je třeba zabránit výrazným časovým posunům při pipetování vzorků a činidel.

Krok	Popis
1. Přidání kalibrátorů, kontrol a neředěných vzorků	Přidejte 20 µl kalibrátorů připravených k použití, kontrol a neředěných vzorků do každé zkušavky. Připravte si další zkušavku pro izolovaný stopový materiál pro stanovení celkové radioaktivity T jako referenci.
2. Přidání stopovací látky	Přidejte 25 µl stopovacího materiálu na zkušavku včetně další zkušavky pro stanovení celkové radioaktivity T jako referenční hodnoty. Referenční zkušavka s celkovou radioaktivitou T by měla být odložena stranou až do analýzy.
3. Inkubace	Inkubujte zkušavky přes noc (nejméně 18 hodin) při pokojové teplotě.
4. Přidání proteinu A	Do každé zkušavky přidejte 50 µl roztoku proteinu A připraveného z L a H a promíchejte vířením.
5. Inkubace	Zkušavky inkubujte 1 hodinu při teplotě 2 °C až 8 °C.
6. Přidání srážecího pufru	Do každé zkušavky přidejte 1 ml studeného srážecího pufru a promíchejte vířením.
7. Odstředování	Zkušavky odstředějte 30 minut při teplotě 2 °C až 8 °C při 2000 x g.
8. Dekantace	Supernatant dekantujte nebo odsajte. Pro odstranění zbývající kapaliny otočte zkušavky dnem vzhůru (30 min.) a kapky absorbujte poklepáním na savý papír.
9. Analýza	Změřte radioaktivitu všech zkušavek včetně T pomocí gama počítadla s doporučenou dobou počítání 1 min.

10 Vyhodnocení testu

10.1 Metrologická návaznost

Imunoanalýza se kalibruje pomocí vnitřního referenčního vzorku. Kvantitativní výsledky jsou vyjádřeny v U/ml.

10.2 Kvantitativní hodnocení

Pro vytvoření standardní křivky se naměřená radioaktivita (počty za minutu; cpm) kalibrátorů vynese proti jejich aktivitám protilátek a koreluje se pomocí spline vyhlazení. Aktivity protilátek neznámých vzorků lze odvodit přímo z jejich naměřené radioaktivity (počty za minutu; cpm) pomocí vygenerované standardní křivky.

Kvantitativní hodnocení může být alternativně založeno na počátečním výpočtu vazebných poměrů B/T (%) vydělením naměřené radioaktivity (počty za minutu; cpm) všech kalibrátorů, kontrol a vzorků pacientů celkovou radioaktivitou T. Pro vytvoření standardní křivky se vypočtené vazebné poměry B/T (%) kalibrátorů vnesou do grafu proti jejich protilátkovým aktivitám a korelují se pomocí spline vyhlazení. Aktivity protilátek

neznámých vzorků lze odvodit přímo z jejich vypočtených vazebných poměrů B/T (%) pomocí vygenerované standardní křivky.

10.3 Validační kritéria

Testovací běhy jsou platné pouze tehdy, jsou-li splněna následující kritéria platnosti:

- cpm nebo B/T (%) $CAL\ 0 < CAL\ 1 < CAL\ 2 < CAL\ 3 < CAL\ 4$
- Kontroly musí vykazovat aktivitu protilátek v rozsahu platnosti uvedeném v certifikátu kontroly kvality.

Pokud tato kritéria nejsou splněna, test není platný a musí se opakovat.

10.4 Řešení problémů

V případě neplatného testu je třeba ověřit data použitelnosti a podmínky skladování, inkubační doby a teploty a přesnou kalibraci všech použitých přístrojů. Pokud se nepodařilo zjistit důvod neplatného provedení testu, obraťte se na dodavatele nebo výrobce výrobku.

10.5 Referenční rozsahy

Referenční rozsahy jsou uvedeny níže:

	Výklad
Aktivita protilátek < 0,4 U/ml	negativní
Aktivita protilátek ≥ 0,4 U/ml	pozitivní

Vzhledem k rozdílné séroprevalenci v jednotlivých regionech by si každá laboratoř měla referenční rozmezí ověřit vlastní analýzou a v případě potřeby je upravit.

10.6 Interpretace výsledků testu

Pozitivní výsledek testu ukazuje na přítomnost specifických protilátek. Negativní výsledek ukazuje na nepřítomnost specifických protilátek, ale nevylučuje možnost autoimunitní reakce. V případě hraničního výsledku testu není možné spolehlivé vyhodnocení.

10.7 Omezení metody

Interpretace výsledků testů musí být vždy zvažována v kombinaci s klinickým obrazem pacienta. Diagnóza by neměla být založena na výsledcích jediné diagnostické metody. Pro stanovení diagnózy je třeba vyhodnotit všechny klinické a laboratorní nálezy. Pro potvrzení by měla být provedena další vyšetření.

11 Charakteristiky provedení

11.1 Analytické charakteristiky provedení

11.1.1 Analytická citlivost a specifická

Mez slepého pokusu (LoB) byla stanovena vícenásobnou analýzou ředícího roztoku. Mez detekce (LoD) byla stanovena vícenásobnou analýzou negativních vzorků. Mez kvantifikace (LoQ) byla vztažena k variačnímu koeficientu uvnitř analýzy 10 % a variačnímu koeficientu mezi analýzami 20 %.

	Analytická citlivost
Mez slepého pokusu (LoB)	< 0,12 U/ml
Mez detekce (LoD)	0,12 U/ml
Mez stanovitelnosti (LoQ)	0,2 U/ml

Vysoká kvalita stopovací látky (125-I jódovaný inzulín) zajišťuje v přímém principu testu, že reaguje pouze IAA a že by neměly existovat žádné detekovatelné zkřížené reakce s autoprotilátkami proti IA2, GAD65, tyreoglobulinu, tyreoidální peroxidáze, TSH receptoru a acetylcholinovému receptoru.

11.1.2 Přesnost

Přesnost výsledků testu byla hodnocena stanovením variability uvnitř testu a mezi testy analýzou více vzorků s různou aktivitou protilátek.

	Přesnost v rámci testu		Přesnost mezi testy	
	U/ml	CV (%)	U/ml	CV (%)
Vzorek 1	0,8	12,1	0,7	10,2
Vzorek 2	1,5	8,6	1,0	10,8
Vzorek 3	3,5	7,7	2,9	9,1
Vzorek 4	8,6	3,6	8,4	7,0
Vzorek 5	24,5	1,3	25,3	3,7

11.1.3 Rozsah měření

V rozsáhlých studiích byla zjištěna spolehlivá přesnost, správnost, preciznost, linearita a výtěžnost výsledků testu v rozsahu měření testu od LoQ po horní kalibrátor. Vzorky s výsledky testů nad horním kalibrátorem by měly být uváděny jako >max. Vzorky s výsledky testů pod LoQ by měly být uváděny jako <min. Pokud jsou pozorovány výsledky testů nad horním kalibrátorem, mohou být vzorky testovány ve vyšším ředění. Výsledná aktivita protilátek se musí vynásobit dodatečným faktorem ředění.

11.2 Diagnostické charakteristiky provedení

11.2.1 Diagnostická citlivost a specifická

Citlivost a specifická byla hodnocena analýzou 21 vzorků pacientů s diabetem 1. typu a 45 vzorků neselektovaných dárců krve.

	Diagnostické provedení
Citlivost	> 99%
Specifická	> 99%

12 Upozornění a bezpečnostní opatření

Výrobek je určen výhradně pro použití v diagnostice *in vitro* kvalifikovaným, autorizovaným a vyškoleným personálem. Se všemi složkami testu a lidskými vzorky je třeba zacházet opatrně jako s potenciálně nebezpečnými. Je třeba dodržovat správnou laboratorní praxi (SLP) a všechny příslušné předpisy.

V případě, že je výrobek poškozen nebo jsou informace o výrobku včetně označení chybné nebo nesprávné, kontaktujte výrobce nebo dodavatele.

Tento výrobek obsahuje přípravky lidského a/nebo živočišného původu. Veškerý materiál získaný z lidských tělních tekutin nebo orgánů použitých k přípravě složek byl testován a shledán negativním na HBsAg (povrchový antigen viru hepatitidy B) a anti-HIV, stejně jako na anti-HCV protilátky. Se všemi složkami a všemi vzorky pacientů je však třeba zacházet jako s potenciálně nebezpečnými v souladu s vnitrostátními právními předpisy a příslušnými pokyny pro biologickou bezpečnost.

Protože výrobek obsahuje potenciálně nebezpečné a/nebo radioaktivní materiály, je třeba dodržovat následující bezpečnostní opatření: Při manipulaci s materiálem soupravy nebo vzorky nekuřte, nejezte a nepijte. Zabraňte přímému kontaktu s materiálem soupravy nebo vzorky tím, že budete nosit ochranné rukavice laboratorní plášť a ochranné brýle. Nikdy nepipetujte materiál ústy. Rozlitý materiál ihned setřete a zasažený povrch důkladně omyjte dekontaminačním prostředkem. Po použití si důkladně umyjte ruce.

Některá činidla obsahují azid sodný (< 0,1 %) jako konzervační látku a nesmí se polykat ani přijít do styku s kůží nebo sliznicí.

Možné tvorbě azidů těžkých kovů v odtoku je třeba zabránit dostatečným oplachováním vodou.

Je třeba dodržovat informace uvedené v bezpečnostním listu o možných nebezpečích, opatřeních první pomoci, opatřeních při neúmyslném úniku velkého množství, manipulaci a skladování, osobních ochranných prostředcích, informacích o likvidaci a toxikologických informacích.

Jakákoli závažná událost, ke které došlo v souvislosti s prostředkem, musí být nahlášena výrobci a příslušnému orgánu členského státu, ve kterém je uživatel a/nebo pacient usazen.

13 Likvidace

Při dekontaminaci a likvidaci je třeba dodržovat doporučení CDC a příslušné místní a národní environmentální směrnice a předpisy. Vzorky, potenciálně kontaminované materiály a infekční odpad musí být dekontaminovány, např. autoklávováním po dobu 20 minut při 121 °C.

Některá činidla obsahují radioaktivní materiál. Kontaminované tkáně, zkumavky, kryty stolů, rukavice apod. je třeba likvidovat ve speciálně označeném kontejneru. Kapalný a pevný radioaktivní odpad likvidujte pouze způsobem povoleným federálními, státními nebo místními úřady a předpisy. Uživatel tohoto výrobku je odpovědný za to, že s radioaktivním materiálem bude nakládat v souladu s národními předpisy danými zákonem nebo jinými prohlášeními místních úřadů.

14 Odkazy

- Hirata Y, H Ishizu, N Ouchi, S Motomura, M Abe, Y Hara, H Wakasugi, I Takahashi, H Sakano, M Tanaka, H Kawao & T Kanesaki: Insulin autoimmunity in a case with spontaneous hypoglycaemia. Japan J. Diabet. 1970, 13, 312 – 9.
- Palmer JP, CM Asplin, P Clemens, K Lyen, O Tatpati, PK Raghu & insulin treatment. Science 1983, 222, 1337 – 9.
- Palmer JP, CM Asplin, PK Raghu, P Clemens, K Lyen, O Tatpati, B McKnight, TL Paquette, M Sperling, L Baker & R Guthrie: Anti-insulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment - a new marker for autoimmune beta cell damage? Pediatr. Adolesc. Endocrinol. 1986, 15, 111 – 6.
- Greenbaum CJ, CP Palmer, B Kuglin & H Kolb: Insulin autoantibodies measured by radioimmunoassay methodology are more related to insulin-dependent diabetes mellitus than those measured by enzyme-linked immunosorbent assay: results of the Fourth International Workshop on the Standardisation of Insulin Autoantibody Measurement. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1992, 74, 1040 – 4.
- Williams AJK, PJ Bingley, E Bonifacio, JP Palmer & Eam Gale: A novel Micro-assay for Insulin Autoantibodies. J. Autoimmunity 1997, 10, 473 – 8.
- Lindberg B, SA Ivarsson, M Landin-Olsson, G Sundkvist, L Svanberg & A Lernmark: Islet autoantibodies in cord blood from Children who developed Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus before 15 years of age. Diabetologia 1999, 42, 181 – 7.

- Potter KN & T J Wilkins: The molecular specificity of insulin autoantibodies. Diabetes Metab. Res. Rev. 2000, 16, 338 – 53.

15 Symboly

	Výrobce
	Označení shody CE
	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>
	Katalogové číslo
	Jedinečný identifikátor prostředku
	Číslo šarže
	Teplotní limit
	Datum spotřeby
	Přečtěte si návod k použití
	Obsahuje dostatečné množství pro <n> testů
	Nepoužívejte opakovaně
	Upozornění
	Chraňte před slunečním zářením
	Radioaktivní materiál nebo ionizující záření
	Kalibrátor
	Kontrola
	Tracer
	Rekonstituční pufr / Pufr
	Srážecí pufr
	Roztok proteinu A

16 Změny

Změny v aktuálním návodu k použití	
Aktuální verze	008/03.2023
Shrnutí změn	Redakční změny v kapitole 2 a 11.1.2