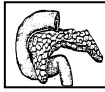


Isletest™-IAA

REF

7011



Qualitativer ELISA-Test zum Nachweis zirkulierender Autoantikörper gegen humanes Insulin

März 2019



I. EINFÜHRUNG UND VERWENDUNGSZWECK

Mit dem Isletest™-IAA-Test können für humanes Insulin spezifische humane IgG nachgewiesen werden. Dies ist ein Screening-Test, der gemeinsam mit weiteren klinischen Informationen bei der Diagnose von Typ I-Diabetes hilfreich ist.

Der insulinabhängige Diabetes mellitus (IDDM) oder Typ I-Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung, bei der der Insulinmangel auf die immunologische Zerstörung der Beta-Zellen im Pankreas zurückzuführen ist. Bei Personen mit einer genetischen Prädisposition des IDDM tritt die immunologische Attacke auf die Beta-Zellen während einer asymptomatischen Periode⁽¹⁾ auf, die auch als "prädiabetische Phase" bezeichnet wird. Diese prädiabetische Phase beginnt gewöhnlich einige Jahre vor dem Einsetzen des klinischen Bilds des IDDM. Während dieser Phase können gegen Inselzellantigene (ICA) des Pankreas und/oder Insulin (IAA) gerichtete Autoantikörper im Blut zahlreicher prädiabetischer Personen nachgewiesen werden.

Insulinautoantikörper (IAA) wurden 1970 zum ersten Mal von Hirata und Kollegen bei einem Patienten mit spontaner Hypoglykämie⁽²⁾ beschrieben. Nachfolgend wurden IAA charakterisiert. Es stellte sich heraus, dass diese zur IgG-Klasse gehören und den Insulinautoantikörpern ähneln, die bei Diabetikern bei einer Behandlung mit Insulin nachgewiesen wurden^(3,4). Die Rolle der IAA im autoimmunologischen Geschehen des IDDM wurde zuerst von Palmer und Kollegen⁽⁵⁾ postuliert, die bei 18 % von frisch diagnostizierten, unbehandelten IDDM-Patienten IAA fanden. Mit einem verbesserten radiometrischen Antikörperassay konnten die Forscher IAA bei ca. 40% der neuen unbehandelten IDDM-Patienten⁽⁶⁾ nachweisen. Andere Labore berichten von einer 20- bis 50-prozentigen Rate, mit der IAA bei neu diagnostizierten IDDM-Patienten nachgewiesen wurde⁽⁷⁻¹²⁾. In einer Studie einer heterogenen Gruppe von Personen mit hohem Risiko (Nicht-Diabetikern, die genetisch bedingt verstärkt an IDDM erkranken, einschließlich unterschiedlicher monozygotischer Zwillinge und ICA-positiver Verwandten ersten Grades) wurden IAA bei 31% der ICA-positiven Personen nachgewiesen. Die Gegenwart von IAA und ICA zeigt eine größere Wahrscheinlichkeit zur nachfolgenden Entwicklung eines IDDM bei diesem Personenkreis⁽¹³⁾. In einer weiteren Studie wurden IAA in 40% der ICA-positiven und 16% der ICA-negativen Verwandten ersten

Grades von IDDM-Patienten nachgewiesen⁽¹⁴⁾. Darüber hinaus wurden Serum-IAA in vier Personen entdeckt, die nachfolgend einen IDDM entwickelten⁽⁹⁾. Der Mechanismus der physiologischen Rolle der IAA in der Pathogenese von IDDM ist bis jetzt ungeklärt.

Die empfindlichste Methode zur Bestimmung der IAA in humanem Serum ist gegenwärtig ein radiometrischer kompetitiver Assay⁽¹⁵⁾. Der Isletest™-IAA ist ein heterogener Enzym-Immunoassay (ELISA) zur IAA-Bestimmung. Er ist leicht durchzuführen und erfordert nicht die Verwendung radioaktiver Materialien. Der Isletest™-IAA ist für Forschungszwecke *in vitro* zum Nachweis zirkulierender Autoantikörper gegen humanes Insulin gedacht.

II. TESTPRINZIP

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit humanem Insulin beschichtet. Positivkontrolle, Negativkontrolle und verdünnte Serumproben werden in die jeweiligen Vertiefungen der Platte gegeben. In der Serumprobe und den Kontrollen enthaltene Human-IgG-spezifische Antikörper gegen Insulin binden an die Insulinmoleküle in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Nach einem Waschprozess zur Beseitigung von nicht-reagierendem Serummaterial wird ein enzymbeladener (alkalische Phosphatase) Ziegen-Antikörper, spezifisch gegen humanes IgG, dem Antigen-Antikörper-Komplex hinzugefügt. Nach sorgfältigem Auswaschen ungebundener Enzyme wird eine Substratlösung (PNPP) hinzugefügt und die entstehende Farbe spektrophotometrisch gemessen. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration der IAA in der Probe. Zwei Qualitätskontrollen (positiv und negativ) sind im Testkit enthalten, um die Assay-Ergebnisse zu kontrollieren und validieren.

III. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Material mit möglicher Gesundheitsgefährdung

Die Matrix der Kalibratoren und Kontrollen besteht aus Humanserum. Die verwendeten Humanseren ergaben bei der Prüfung auf HbsAg bzw. Antikörper gegen HIV-1/2 und HCV mit von der amerikanischen Nahrungsmittel- und Drogenbehörde (FDA) lizenzierten Reagenzien ein negatives Ergebnis. Da es jedoch kein Testverfahren gibt, das das Vorhandensein von HIV, Hepatitis B Virus oder anderen infektiösen Erregern mit absoluter Sicherheit ausschließen kann, sind die Reagenzien als potentiell infektiöses Material zu behandeln.

2. Natriumazid

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei, Kupfer oder Messing explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung dieser Materialien sind die speziellen Richtlinien zu beachten.

3. Stopplösung

Bei der Stopplösung handelt es sich um 1N NaOH. Beim Umgang mit dieser starken Base ist Vorsicht geboten. Sie kann Verätzungen verursachen und sollte nur mit Handschuhen angefasst werden. Empfehlenswert sind darüber hinaus Schutzkleidung und Schutzbrille, ein Einatmen ist zu vermeiden. Verschüttete Säure sollte zunächst mit Wasser verdünnt werden, bevor sie mit Papiertüchern aufgenommen wird.

9. Substratlösung

Substratlösung besteht aus para-Nitrophenylphosphaten (PNPP), einem chromogenen Nicht-Protein-Substrat, das in diesem ELISA-Test verwendet wird. Gelegentlich kann das Substrat eine gelbliche Farbe aufweisen. Diese Farbe beeinträchtigt nicht die Testergebnisse.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Die Testreagenzien dürfen nicht eingefroren werden. Alle Testkit-Komponenten sind ständig bei 2 - 8° C zu lagern.
2. Positive und negative Kontrollen müssen in jedem Testlauf mitgeführt werden.

- Es sollten nur klare Serumproben verwendet werden. Übermäßig getrübe, hämolytische oder mikrobiell kontaminierte Proben dürfen nicht verwendet werden.
- Alle Proben sind in Doppelbestimmung zu analysieren.
- Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht gemischt werden.
- Reagenzien mit abgelaufenem Haltbarkeitsdatum dürfen nicht mehr verwendet werden.
- Reagenzien nicht über einen längeren Zeitraum bei Raumtemperatur aufbewahren.
- Die Substratlösung ist im Dunkeln aufzubewahren.
- Ein sorgfältiges Pipettierverfahren ist notwendig, um reproduzierbare und genaue Ergebnisse zu erzielen.

IV. REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Im Lieferumfang enthaltene Materialien:

- PLA IAA** = IAA-Mikrotiterstreifen (mit Halterung)..... 12
- CONJ ENZ 6X** = IAA-Anti-Human-IgG-Enzymkonjugat (Konz.)
2 x 1,0 ml
- DIL SPE 5X** = IAA-Probenverdünnungspuffer (Konzentrat)
1 x 25,0 ml
- CONJ ENZ DIL** = Isletest-Konjugatverdünnungspuffer 1 x 10,0 ml
- CTRL REF IAA** = IAA- Referenzkontrolle (Humanserum) 1 x 1,5 ml
- CTRL + IAA** = IAA-Positivkontrolle (Humanserum) 1 x 1,5 ml
- CTRL - IAA** = IAA-Negativkontrolle (Humanserum) 1 x 1,5 ml
- SUBS PNPP** = Isletest-Substratlösung (PNPP)..... 1 x 15,0 ml
- BUF WASH 25X** = Isletest-Waschpuffer (Konzentrat) . 1 x 20,0 ml
- SOLN STP** = Isletest-Stopplösung (1N NaOH)..... 1 x 6,0 ml

V. WEITERE ERFORDERLICHE, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
- Zellstoff zum Trocknen der Streifen nach dem Waschen sowie Parafilm bzw. Plastikfolie zum Abdecken der Streifen während der Inkubation.
- Glasröhrchen in passenden Größen zur Serumverdünnung.
- Mikropipetten mit auswechselbaren Spitzen 10 µl, 50 µl und 100 µl.
- Ein Plattenwaschgerät oder eine Spritzflasche zum Waschen der Mikrotiterplatten.
- 5-ml-Pipetten zur Pipettierung von Konjugatverdünnungspuffer.
- Ein 500-ml-Messzylinder.
- Mikrotiterplatten-Lesegerät mit einer Absorptionskapazität von 405 nm.
- Plastiketikettierband zum Verschließen unbenutzter Vertiefungen vor dem Test.

VI. PROBENGEWINNUNG

5-10 ml Blut werden durch Venenpunktion entnommen und in einem Gerinnungsröhrchen (roter Verschluss) gesammelt. Serumseparatoren können verwendet werden. Das Serum wird durch Zentrifugation gewonnen. Serumproben bei 2 - 8° C lagern. Übermäßig hämolytische Proben sowie Proben, die große Gerinnsel enthalten oder durch mikrobielles Wachstum kontaminiert sind, können die Testergebnisse beeinflussen. Wenn die Serumproben nicht innerhalb von 24 Stunden bestimmt werden können, sind sie bei -20°C einzufrieren.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

1. Rekonstitution des IAA-IgG-Enzymkonjugats:

Exakt 5 ml des Isletest-Konjugatverdünnungspuffers werden in eine Flasche, die das IAA-IgG-Enzymkonjugat (Konzentrat) enthält, überführt. Flasche verschließen und Inhalt durch mehrfaches Umkehren der Flasche gründlich mischen. Verdünntes Konjugat ständig bei 2 - 8° C aufbewahren. Datum der Rekonstitution auf dem Etikett vermerken.
Verdünntes Reagenz 30 Tage nach Rekonstitution nicht mehr

verwenden. Die beiden Konjugat(konzentrat)flaschen reichen jeweils für 6 Mikrotiterstreifen aus. Rekonstitution nach Bedarf.

2. IAA-Probenverdünnungspuffer:

Falls das Probenverdünnungspuffer-Konzentrat aufgrund einer Lagerung bei Temperaturen unterhalb von 2 °C - 8 °C einen Niederschlag (Präzipitat) enthält, muss dies in einem Wasserbad bei 37 °C für 30 Minuten wieder gelöst werden. Gesamten Inhalt (25 ml) in ein geeignetes Gefäß mit 100 ml destilliertem/deionisiertem Wasser geben. Gründlich mischen, Gefäß mit "IAA-Probenverdünnungspuffer" beschriften und bei 2 - 8°C lagern. Das verdünnte Reagenz ist bis zu dem auf der Flasche angegebenen Verfallsdatum haltbar.

3. Isletest-Waschlösung:

Sind aufgrund einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen (2 bis 8 °C) Kristalle im Waschpuffer-Konzentrat vorhanden, sind die Kristalle durch ein 30-minütiges Platzieren des Gefäßes in ein 37 °C-Wasserbad oder einen Inkubator aufzulösen. Gesamten Inhalt in ein 500-ml-Gefäß mit 480 ml destilliertem/deionisiertem Wasser geben. Gründlich mischen, Gefäß mit "Isletest-Waschlösung" beschriften und bei 2 - 8°C lagern. Das verdünnte Reagenz ist bis zu dem auf der Flasche angegebenen Verfallsdatum haltbar.

4. Vorbereitung der Serumprobe:

Exakt 10 µl (0,010 ml) der Serumprobe werden in 1,0 ml des Probenverdünnungspuffers in ein bereits etikettiertes Glasröhrchen pipettiert. Gründlich mischen.

VIII. TESTVERFAHREN

Das Testkit enthält 12 mit humanem Insulin beschichtete Mikrotiterstreifen. Die Anzahl der in jedem Assay verwendeten Mikrotiterstreifen hängt von der zu testenden Anzahl Serumproben ab. Wenn 12 Mikrotiterstreifen verwendet werden, können mit diesem Testkit insgesamt 45 Patientenseren in Doppelbestimmung getestet werden.

WICHTIGER HINWEIS: Vor Testbeginn müssen alle Reagenzien einschließlich Serumproben auf Raumtemperatur (25°C) gebracht werden. Inkubationstemperaturen, die um mehr als ± 1°C abweichen, beeinflussen nachgewiesenermaßen die Ergebnisse.

- Die für den Test benötigte Anzahl an Streifen in die mitgelieferte Halterung einsetzen. Die Mikrotiterstreifen müssen an der dafür vorgesehenen Stelle fest einrasten, da sie ansonsten hinausfallen und zerbrechen können.
- Machen Sie sich mit dem Indexsystem der Vertiefungen vertraut, z.B. Vertiefung A1, B1, C1, D1 usw. Verwendete Streifen mit wasserfestem Stift markieren.
- 100 µl IAA-Referenzkontrolle in die Vertiefungen C1 und D1 pipettieren.
- 100 µl IAA-Negativkontrolle in die Vertiefungen E1 und F1 pipettieren.
- 100 µl IAA-Positivkontrolle in die Vertiefungen G1 und H1 pipettieren.
- 100 µl der verdünnten Serumprobe (siehe VII. Vorbereitung der Reagenzien und Lagerung, Punkt 4) in die Vertiefungen A2 und B2 pipettieren. Für weitere Serumproben die entsprechende Anzahl zusätzlicher Streifen verwenden und die verdünnten Proben in Doppelbestimmung in die Vertiefungen pipettieren. In jeder Vertiefung sollten sich 100 µl zu testender Lösung befinden, mit Ausnahme der Vertiefungen A1 und B1, die momentan noch leer sind und zu einem späteren Zeitpunkt verwendet werden.
- Alle auf einem Streifen nicht verwendeten Vertiefungen sind sorgfältig abzudecken und für den nächsten Testansatz aufzubewahren. Alle nicht benötigten Streifen sind sorgfältig in dem dafür vorgesehenen Gleitverschlussbeutel mit Trockenmittel bis zum nächsten Testansatz bei 2 - 8° C aufzubewahren.

8. Platte mit Parafilm oder Plastikfolie abdecken, um eine Kontamination zu vermeiden und über Nacht (12 - 16 Stunden) bei 2 - 8° C stehen lassen.
9. Am nächsten Morgen Lösung durch ruckartiges Umdrehen der Mikrotiterplatte abgießen. Platte vorsichtig auf einem Zelltuch trocken klopfen. Falls ein automatisches Waschgerät verwendet wird, jede Vertiefung dreimal mit 300 µl Waschpuffer waschen (siehe VII. Vorbereitung der Reagenzien und Lagerung, Punkt 3). Bei Verwendung einer Spritzflasche Vertiefungen sorgfältig mit Waschpuffer füllen und Puffer aus den Vertiefungen wegschütten. Verfahren zwei Mal wiederholen. Platte auf Papiertuch trocken klopfen.
10. 100 µl IAA-IgG-Enzymkonjugatreagenz (siehe VII. Vorbereitung der Reagenzien und Lagerung, Punkt 1) in jede Vertiefung pipettieren, mit Ausnahme der Vertiefungen A1 und B1.
11. Platte mit Parafilm oder Plastikfolie bedecken und 1 Stunde bei 25° ± 1° C stehen lassen.
12. Nach Inkubation Waschschrift (Punkt 9) wiederholen und die Vertiefungen der Mikrotiterplatte trocken klopfen.
13. 0,1 ml (100 µl) Substratlösung in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte, einschließlich der Vertiefungen A1 und B1, pipettieren. Es sollte sichergestellt werden, dass das Substratreagenz schnell und ohne Unterbrechung pipettiert wird. Gelegentlich kann das Substrat eine gelbliche Farbe aufweisen. Diese Farbe beeinträchtigt nicht die Testergebnisse.
14. Platte abdecken und 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (25°C ± 1° C) stehen lassen.
15. Nach 30 Minuten 50 µl Stopplösung schnell und ohne Unterbrechung in jede Vertiefung pipettieren.
16. Mikrotiterplatten-Lesegerät gemäß Herstellerhinweisen einstellen und Absorption bei 405 nm messen. Die Vertiefungen A1 und B1 können zur Leerwerteinstellung des Lesegeräts verwendet werden.
17. Daten gemäß Abschnitt IX auswerten.

IX. TESTAUSWERTUNG

Die spektrophotometrisch erhaltenen optischen Dichten (OD) in Absorptionseinheiten werden wie im Beispielprotokoll für Isletest™-IAA aufgezeichnet. Die tatsächlich in den angesetzten Isletest™-IAA gemessenen OD-Ergebnisse können evtl. hiervon abweichen. Dies ist nur ein Beispiel.

1. Den Mittelwert der OD-Ergebnisse der Referenz-, Negativ- und Positivkontrolle sowie der in Doppelbestimmung vorgenommenen Patientenproben berechnen.

Mittlere OD: Referenz (\bar{R}), Negativ (\bar{N}), Positiv (\bar{P}), Proben (\bar{S})

2. Die mittlere OD der Proben und Kontrollen durch den \bar{R} -Wert dividieren. Das ergibt den Verhältniswert für die einzelnen Proben.

Interpretation der Ergebnisse:

<u>IAA-Verhältniswert (U/mL)</u>	<u>Ergebnis</u>
< 0,95	Negativ
> 1,05	Positiv
0,95 – 1,05	Nicht determiniert (Grenzwert)

Proben mit Verhältniswerten von < 0,95 weisen auf eine niedrige und Werte von > 1,05 auf eine hohe Konzentration von IAA hin. Proben mit Werten zwischen 0,95 und 1,05 werden als nicht determiniert betrachtet. Nicht determinierte Proben sollten wiederholt oder parallel zu einer neuen (später entnommenen) Probe durchgeführt werden.

Abschnitt A: Kontrollergebnisse

Daten			Verhältniswert	Ergebnis
Kontrollen	OD	Mittl. OD		
Referenzkontrolle	1,224	$\bar{R} = 1,247$	1,00	
	1,271			
Negativkontrolle	0,498	$\bar{N} = 0,481$	0,39	Negativ
	0,464			
Positivkontrolle	1,855	$\bar{P} = 1,809$	1,45	Positiv
	1,764			

Hinweis: Als gültiges Verhältniswert-Testergebnis gelten $\bar{N} < 0,95$ und $\bar{P} > 1,05$

Im Falle eines ungültigen Testergebnisses muss der Test wiederholt werden.

Abschnitt B: Ergebnisse der Patientenproben

Daten			Verhältniswert	Ergebnis
Probe	OD	Mittl. OD		
Referenzkontrolle	1,224	$\bar{R} = 1,247$	1,00	
	1,271			
1	1,994	$\bar{S}_1 = 2,002$	1,61	Positiv
	2,010			
2	0,540	$\bar{S}_2 = 0,541$	0,43	Negativ
	0,542			
3	1,281	$\bar{S}_3 = 1,270$	1,02	Nicht determiniert
	1,261			

X. QUALITÄTSKONTROLLE

Positiv- und Negativkontrollen müssen gemeinsam mit den unbekanntem Serumproben in jedem Testlauf mitgeführt werden, um die Richtigkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Die Negativkontrolle sollte einen Verhältniswert von < 0,95 U/ml zeigen und der Wert der Positiv-Kontrolle sollte bei > 1,05 U/ml liegen.

XI. LEISTUNGSMERKMALE

Der Isletest™-IAA ist ein qualitativer Test zum Nachweis von zirkulierenden Autoantikörpern gegen humanes Insulin. Die auf der Mikrotiterplatte aufgetragenen Antigene reagieren nicht mit anderen Autoantikörpern wie Inselzellautoantikörpern, Anti-Thyreoglobulin und Anti-Rheumafaktoren.

In einer Studie von 100 zufällig ausgewählten, in unserem klinischen Labor entnommenen Serumproben, wurden in zwei Proben messbare IAA-Titer festgestellt. Darüber hinaus waren von 40 neu diagnostizierten IDDM-Patienten im ELISA-Test 40 % IAA-positiv. Diese Werte stimmen eng mit den in der Literatur veröffentlichten Werten überein (siehe Literaturhinweise 6-12).

XII. KLINISCHE BEDEUTUNG

Dieses *in vitro* Testverfahren dient zum Nachweis von Autoantikörpern gegen humanes Insulin in Patientenserum. Ergebnisse, die alleine mittels dieses Verfahrens gewonnen wurden, sind nicht für die Diagnose eines IDDM geeignet.

Schwachpositive und grenzwertige Proben (innerhalb 5% dem Referenzkontrolle OD) sind aufzubewahren und bei -20° C zu lagern. Frische Proben dieser Patienten sind nach jeweils 6 Monate zusammen mit den früheren Proben erneut zu testen.

DIES IST LEDIGLICH EIN SCREENING-TEST. EINE IDDM-DIAGNOSE IST UNTER EINBEZUG DER MEDIZINISCHEN VORGESCHICHTE DES PATIENTEN, DER KLINISCHEN SYMPTOME UND DER ERGEBNISSE AUS WEITEREN TESTS ZU STELLEN.

XIII. GRENZEN DES VERFAHRENS UND FEHLERQUELLEN

1. Dies ist lediglich ein qualitativer Screening-Test.
2. Eine alte Substratlösung kann einen höheren Background in der Farbentwicklung ergeben.
3. Eine schlechte Testreproduzierbarkeit kann folgende Ursachen haben:
 - a. Lieferabweichungen bei Reagenzien
 - b. Unsachgemäße Lagerung der Reagenzien
 - c. Unsachgemäße Rekonstitution der Reagenzien
 - d. Unzureichendes Waschen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte
 - e. Substratreagenz ist alt oder wurde dem Licht ausgesetzt
 - f. Unstabiles oder defektes Spektrophotometer
 - g. Fehler beim Befolgen der Angaben zur Assay-Durchführung









Es ist daher unbedingt erforderlich, dass die Anweisungen sorgfältig und konsequent befolgt werden. Für eine bessere Reproduzierbarkeit sollten Testbedingungen und Testmaterialien nicht erheblich voneinander abweichen.

XIV. LITERATUR

1. Eisenbarth, G.S., J. Connelly, and J.S. Soeldner (1987). The natural history of type I diabetes. *Diabet./Metab. Rev.*, **3**:873-891.
2. Hirata, Y., H. Ishizu, N. Ouchi, S. Motomura, M. Abe, Y. Hara, H. Wakasugi, I. Takahashi, H. Sakano, M. Tanaka, H. Kawao, and T. Kanasaki (1970). Insulin autoimmunity in a case with spontaneous hypoglycemia. *Japan J. Diabet.*, **13**:312-319.
3. Goldman, J., D. Baldwin, A.H. Rubenstein, D.D. Klink, W.G. Blackard, L.K. Fisher, T.F. Roe, and J.J. Schnure (1979). Characterization of circulating insulin and proinsulin-binding antibodies in autoimmune hypoglycemia. *J. Clin. Invest.*, **63**:1050-1059.
4. Seino, S., Z.Z. Fu, W. Marks, Y. Seino, H. Imura, and A. Vinik (1986). Characterization of circulating insulin antibodies in insulin autoimmune syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **62**:64-69.
5. Palmer, J.P., C.M. Asplin, P. Clemens, K. Lyen, O. Tatpati, P.K. Raghu, and T.L. Paquette (1983). Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*, **222**:1337-1339.
6. Palmer, J.P., C.M. Asplin, P.K. Raghu, P. Clemens, K. Lyen, O. Tatpati, B. McKnight, T.L. Paquette, M. Sperling, L. Baker, and R. Guthrie (1986). Anti-insulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment - a new marker for autoimmune beta cell damage? *Pediatr. Adolesc. Endocrinol.*, **15**:111-116.
7. Atkinson, M.A., N.K. Maclaren, W.J. Riley, W.E. Winter, D.D. Fisk, and R.P. Spillare (1986). Are insulin antibodies markers for insulin-dependent diabetes mellitus? *Diabetes*, **35**:894-898.
8. Karjalainen, J., M. Knip, A. Mustonen, J. Ilonen, and H.K. Akerblom (1986). Relation between insulin antibody and complement-fixing islet cell antibody at clinical diagnosis of IDDM. *Diabetes*, **35**:620-622.
9. McEvoy, R.C., M.E. Witt, F. Ginsberg-Fellner, and P. Rubinstein (1986). Anti-insulin antibodies in children with type I diabetes mellitus; genetic regulation of production and presence at diagnosis before insulin replacement. *Diabetes*, **35**:634-641.
10. Arslanian, S.A., D.J. Becker, B. Rabin, R. Atchison, M. Eberhardt, D. Cavender, J. Dorman, and A.L. Drash (1985). Correlates of insulin antibodies in newly diagnosed children with insulin-dependent diabetes before insulin therapy. *Diabetes*, **34**:926-930.

11. Wilkin, T., M. Armitage, C. Casey, D.A. Pyke, M. Rodier, J.L. Diaz, and R.D.G. Leslie (1985). Value of insulin autoantibodies for insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*, **I**:480-482.
12. Bergmann, S., J. Ludwigsson, C. Binder, and T. Mandrup-Paulson (1985). Insulin antibodies before treatment in ICA-positive children with IDDM. *Diab. Res. Clin. Pract.* (Suppl. 1), XII IDF Meeting, Madrid.
13. Srikanta, S., A.T. Ricker, D.K. McCulloch, J.S. Soeldner, G.S. Eisenbarth, and J.P. Palmer (1986). Autoimmunity to insulin, beta cell dysfunction, and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, **35**:139-142.
14. Dean, B.M., F. Becker, J.M. McNally, A.C. Tarn, G. Schwart, E.A.M. Gale, and Bottazo, G.F. (1986). Insulin autoantibodies in the pre-diabetic period: correlation with islet cell antibodies and development of diabetes. *Diabetologia*, **29**:339-342.
15. Vardi, P., A.G. Zeigler, J.H. Mathews, S. Dib, R.J. Keller, A.T. Ricker, J.I. Wolfsdorf, R.D. Herskowitz, A. Rabizadeh, G.S. Eisenbarth, and J.S. Soeldner (1988). Correlation of insulin autoantibodies at onset of type I diabetes: inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care*, **11**:736-739.

XV. SYMBOLE

	Lagerungstemperatur
	Stapelcode
	Ablauf
	Hersteller
	Autorisierter vertreter
	Achtung, Siehe Anweisungen
	Für die <i>in vitro</i>-Diagnostik vorgesehen
	Katalog-Nr.


XVI. BEZUGSNACHWEIS

BESTELLUNGEN: Bestellungen sind zu richten an:

 **BIOMERICA, INC.** zC f8C
 17571 Von Karman Avenue
 Irvine, California 92614 [IVD]
 U.S.A.
 Telefon: +1-(949) 645-2111 CE
 Fax: +1-(949) 553-1231
 Website: www.biomerica.com
 E-Mail: bmra@biomerica.com

67011-08_ger.doc

März 2019


 gemäß IVDD 98/79/ EC
 MDSS GmbH
 Schiffgraben 41
 D-30175 Hannover
 Deutschland