

Kit para ELISA de triple detección de autoanticuerpos anticélulas de los islotes – Instrucciones de uso



RSR Limited

Parc Ty Glas, Llanishen,
Cardiff CF14 5DU Reino Unido

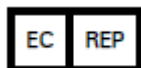
Tel.: +44 29 2068 9299

Fax: +44 29 2075 7770

Correo electrónico:

Sitio web: www.rsrltd.com

info@rsrltd.com



Flr.,

Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd

Tower Street, Swatar, BKR 4013

Malta.

USO PREVISTO

El kit para ELISA de triple detección de autoanticuerpos anticélulas de los islotes (3 Screen) de RSR es solo para uso profesional y está previsto para la determinación cuantitativa de autoanticuerpos anti-GAD, anti-IA-2 y anti-ZnT8 en suero humano. Los autoanticuerpos contra los antígenos de las células β pancreáticas son marcadores serológicos importantes de la diabetes mellitus de tipo 1 (DM1). Los antígenos identificados por estos anticuerpos son la insulina, la descarboxilasa del ácido glutámico (isoforma de 65 kDa, GAD₆₅), el antígeno de células de los islotes denominado IA-2 o ICA-512 y el transportador de zinc 8 (ZnT8). El kit para ELISA 3 Screen de RSR permite realizar mediciones simultáneas de autoanticuerpos anti-GAD, anti-IA-2 y anti-ZnT8 en la misma muestra.

REFERENCIAS

M. Amoroso et al

“3 Screen islet cell autoantibody ELISA: A sensitive and specific ELISA for the combined measurement of autoantibodies to GAD₆₅, to IA-2 and to ZnT8.”

Clin. Chim. Acta. 2016 462:60 – 64

A. G. Ziegler et al

“3 Screen ELISA for high-throughput detection of beta cell autoantibodies in capillary blood.”

Diabetes Technol. Ther. 2016 18:687 – 693

PATENTES

Se aplican las siguientes patentes:

Patentes europeas EP 1 563 071 B1 y EP 2 118 309 B1, patentes chinas CN 1738900 B y ZL 200780051859.3, patente india 279741, patentes japonesas 4498144 y 5694668 y patentes estadounidenses US 8,129,132 B2, US 7,851,164 B2 y US 9,023,984 B2.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

En el ensayo ELISA 3 Screen de RSR, se deja que los autoanticuerpos anti-GAD, anti-IA-2 y anti-ZnT8 en los sueros de paciente, la preparación de referencia o los calibradores (opcional) y los controles interactúen con la

GAD₆₅, el IA-2 y el ZnT8 que recubren los pocillos de la placa de ELISA. Tras incubar durante 16–20 horas, se desechan las muestras dejando los autoanticuerpos anti-GAD, anti-IA-2 o anti-ZnT8 en los sueros de paciente, la preparación de referencia o los calibradores (opcional) y los controles unidos a la GAD₆₅, el IA-2 y el ZnT8 que recubren los pocillos de la placa. En un segundo paso de incubación, se añade una mezcla de GAD₆₅-biotina, IA-2-biotina y ZnT8-biotina y, debido a la capacidad de los autoanticuerpos anti-GAD, anti-IA-2 y anti-ZnT8 de actuar de forma bivalente, se forma un puente entre la GAD₆₅, el IA-2 o el ZnT8 inmovilizados en la placa y la GAD₆₅-biotina, el IA-2-biotina y el ZnT8-biotina, respectivamente. A continuación, en un paso de lavado, se elimina la GAD₆₅/IA-2/ZnT8-biotina que no se ha unido y, en un tercer paso de incubación, se determina la cantidad de GAD₆₅/IA-2/ZnT8-biotina unida mediante la adición de estreptavidina-peroxidasa (SA-POD), que se une específicamente a la biotina. Luego se desecha el exceso de SA-POD que no se ha unido y se añade el sustrato de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), que produce la aparición de un color azul. Esta reacción se detiene mediante la adición de una solución de parada, que hace que el contenido de los pocillos se vuelva de color amarillo. Por último, se lee la absorbancia de la mezcla de reacción amarilla a 450 nm y 405 nm con un lector de placas de ELISA. Una mayor absorbancia indica la presencia autoanticuerpos anti-GAD, anti-IA-2 o anti-ZnT8 en la muestra problema. La lectura a 405 nm permite la determinación cuantitativa de absorbancias altas. Se recomienda medir los valores de absorbancia baja a 450 nm. Si solo es posible leer a una longitud de onda, podría utilizarse la longitud de 405 nm.

CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROBLEMA DE SUERO

Los sueros a examinar deben analizarse poco después de su separación o conservarse, a ser posible en partes alícuotas, a una temperatura de –20 °C o inferior. La cantidad de 50 μ l es suficiente para un ensayo (RSR recomienda determinaciones de 25 μ l por duplicado). Deben evitarse la congelación y descongelación repetidas, así como el aumento de la temperatura de conservación. No utilizar muestras de suero hemolizado o de aspecto lechoso por exceso de lípidos. No utilizar plasma en el ensayo. Cuando se requiera, dejar que los sueros problema alcancen la temperatura ambiente y mezclar con cuidado para asegurar la homogeneidad. Centrifugar los sueros antes del ensayo (preferiblemente durante 5 min a 10 000 r.p.m., es decir, alrededor de 10 000 g en una microcentrífuga) para eliminar las partículas. No debe omitirse este paso de centrifugación en el caso de sueros turbios o con partículas.

SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
	Declaración CE de conformidad
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>

	Número de catálogo
	Código de lote
	Consúltense las instrucciones de uso
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> utilizations
	Fecha de caducidad
	Limitación de temperatura
	Control negativo
	Control positivo

MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

Pipetas para dispensar 25 µl y 100 µl.

Medios para medir distintos volúmenes para la reconstitución o dilución de los reactivos.

Agua pura.

Lector de placas de ELISA adecuado para formatos de 96 pocillos y que permita medir a 450 nm y 405 nm.

Agitador de placas de ELISA con una velocidad de 500 agitaciones/min (que no sea un agitador orbital).

Tapas para placas de ELISA.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS SUMINISTRADOS

Conservar los kits sin abrir y todos los componentes (A-M) a una temperatura de 2–8 °C.

A	Pocillos recubiertos con 3 Screen 12 tiras rompibles de 8 pocillos cada una (96 en total) en un marco de soporte, dentro de una bolsa sellada de aluminio. Dejar en reposo a temperatura ambiente (20–25 °C) durante al menos 30 minutos antes de abrir.
	Asegurarse de que las tiras están bien encajadas en el marco de soporte suministrado. Tras la apertura, volver a introducir las tiras de pocillos sin utilizar en la bolsa de aluminio original con desecante suministrada y sellar con cinta adhesiva. Colocar esta bolsa dentro de la bolsa de plástico de autocierre y conservar a 2–8 °C durante un máximo de 3 meses.
B	Control negativo 0,3 ml Listo para usar
C1	Control positivo de anticuerpos anti-GAD 0,3 ml Listo para usar
C2	Control positivo de anticuerpos anti-IA-2 0,3 ml Listo para usar
C3	Control positivo de anticuerpos anti-ZnT8

	0,3 ml Listo para usar
D	Preparación de referencia 0,3 ml Lista para usar
E1-5	Calibradores (opcional) 5, 15, 100, 400 y 2000 u/ml (unidades RSR arbitrarias) 5 × 0,3 ml Listo para usar
F	Solución de lavado concentrada 125 ml Concentrada Diluir 10x con agua pura antes de utilizar. Conservar a 2–8 °C hasta la fecha de caducidad del kit.
G	3 Screen-biotina 3 viales Liofilizado Inmediatamente antes del uso, reconstituir cada vial con 5,5 ml de tampón de reconstitución de 3 Screen-biotina (H). Si se va a utilizar más de un vial, agruparlos y mezclar con cuidado antes de utilizarlos.
H	Tampón de reconstitución de 3 Screen-biotina 2 × 15 ml, color rojo Listo para usar
J	Estreptavidina-peroxidasa (SA-POD) 0,7 ml Concentrada Diluir 1:20 con diluyente para SA-POD (K). Por ejemplo, 0,5 ml (J) + 9,5 ml (K). Conservar a 2–8 °C durante un máximo de 28 semanas tras la dilución.
K	Diluyente para SA-POD 15 ml Listo para usar
L	Sustrato de peroxidasa (TMB) 15 ml Listo para usar
M	Solución de parada 12 ml Listo para usar

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Dejar reposar todos los reactivos y sueros de ensayo a temperatura ambiente (20–25 °C) durante al menos 30 minutos antes de utilizarlos, salvo 3 Screen-biotina y el tampón de reconstitución de 3 Screen-biotina. Se recomienda utilizar una pipeta de repetición de tipo Eppendorf en los pasos 4, 7, 10 y 11.

Día 1	1.	Pipetear 25 µl de control negativo (B), controles positivos (C1–3), preparación de referencia (D) o (si se utilizan) calibradores (E1-5) y sueros de paciente en los pocillos correspondientes (A) (se recomienda hacerlo por duplicado), dejando un pocillo vacío para el blanco (ver el paso 12).
	2.	Tapar el marco de soporte y agitar durante unos 5 segundos en un agitador de placas

		de ELISA (500 agitaciones por minuto) e incubar a 2–8 °C (sin agitar) durante la noche (16–20 horas).
Día 2	3.	Utilizar un lavador de placas de ELISA para aspirar y lavar la placa tres veces con solución de lavado (F) diluida. Si no se dispone de un lavador de placas, desechar el contenido de los pocillos invirtiendo rápidamente el marco de soporte de los pocillos encima de un recipiente adecuado, lavar los pocillos tres veces de forma manual y, finalmente, golpear suavemente los pocillos invertidos sobre una superficie absorbente limpia y seca.
	4.	Pipetear 100 µl de 3 Screen-biotina (G) reconstituido frío en cada pocillo (excepto el blanco). Evitar que el material salpique fuera de los pocillos durante la adición.
	5.	Tapar el marco de soporte e incubar a 2–8 °C durante 1 hora (sin agitar).
	6.	Repetir el paso 3 de lavado.
	7.	Pipetear 100 µl de SA-POD (J) diluida en cada pocillo (excepto el blanco).
	8.	Tapar el marco de soporte e incubar a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 20 minutos en un agitador de placas de ELISA (500 agitaciones por minuto).
	9.	Repetir el paso 3 de lavado. Si se lava de forma manual, utilizar un paso de lavado adicional con agua pura (para eliminar la espuma) antes de secar los pocillos invertidos golpeando suavemente.
	10.	Pipetear 100 µl de TMB (L) en cada pocillo (incluido el blanco) e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 20 minutos sin agitar.
	11.	Pipetear 100 µl de solución de parada (M) en cada pocillo (incluido el blanco), tapar el marco de soporte y agitar durante unos 5 segundos en un agitador de placas (500 agitaciones por min). Hay que asegurarse de que las incubaciones con el sustrato sean las mismas para cada uno de los pocillos.
	12.	Al cabo de 10 minutos, leer la absorbancia de cada pocillo a 405 nm y 450 nm con un lector de placas de ELISA, utilizando como blanco el pocillo que contiene únicamente 100 µl de TMB (L) y 100 µl de solución de parada (M).

datos de absorbancia a 405 nm.

El 97 % de 1200 sueros de donantes de sangre varones adultos sanos dio valores de índice inferiores a 30, lo que indica que los valores de índice de 30 o superiores pueden considerarse positivos en este grupo (ver página 4).

RESULTADOS TÍPICOS (a modo de ejemplo; no utilizar para calcular los resultados reales)

	Abs. 450 nm	Valor de índice	Abs. 405 nm	Valor de índice
Preparación de referencia (D)	0,547	100	0,173	100
Control negativo (B)	0,036	6,6	0,013	7,5
Control positivo (C1)	1,200	219	0,379	219
Control positivo (C2)	0,485	89	0,154	89
Control positivo (C3)	0,235	43	0,075	43

VALOR DE CORTE DEL ÍNDICE DEL ENSAYO

Negativo	<30
Positivo	≥30

Cálculo de resultados con calibradores

Se puede establecer una curva de calibración representando gráficamente la concentración de calibrador en el eje de las abscisas (escala logarítmica) y la absorbancia de los calibradores en el eje de las ordenadas (escala lineal). A continuación, se puede leer la concentración de autoanticuerpos anti-GAD, anti-IA-2 o anti-ZnT8 en los sueros de paciente a partir de la curva de calibración (representada en RSR en forma de curva *spline* semilogarítmica [factor de ajuste = 0]). Se pueden utilizar otros métodos de reducción de datos. El control negativo (B) tiene una concentración de 0 u/ml, pero se le puede asignar un valor de 0,5 u/ml para facilitar el tratamiento informático de los datos.

RESULTADOS TÍPICOS (a modo de ejemplo; no utilizar para calcular los resultados reales)

	Abs. 450 nm	Conc. u/ml	Abs. 405 nm	Conc. u/ml
Control negativo (B)	0,036	0	0,013	0
E1	0,072	5	0,023	5
E2	0,130	15	0,041	15
E3	0,539	100	0,170	100
E4	2,212	400	0,701	400
E5	7,929*	2000	2,332	2000
Control positivo (C1)	1,200	226	0,379	219
Control positivo (C2)	0,485	89	0,154	90
Control positivo (C3)	0,235	39	0,075	42

*Obtenido del valor a 405 nm

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Cálculo de resultados sin calibradores

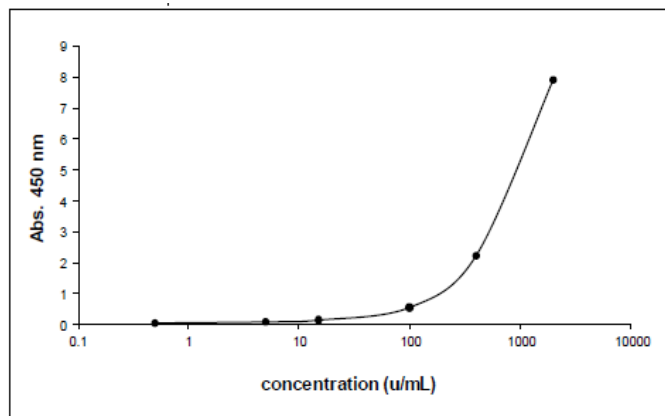
Cálculo de índices

Los valores de índice se calculan de la siguiente manera:

$$\text{Índice} = \frac{\text{absorbancia de la muestra problema a 450 nm}}{\text{absorbancia de la preparación de referencia a 450 nm}} \times 100$$

El valor de índice también se puede calcular utilizando

Para las lecturas de absorbancia a 450 nm superiores a 3,0, la lectura de absorbancia a 405 nm puede convertirse a valores de absorbancia a 450 nm multiplicando por el factor adecuado (3,4 en el caso del equipo utilizado en RSR).



Las muestras con una concentración elevada de autoanticuerpos anti-GAD, anti-IA-2 o anti-ZnT8 pueden diluirse con el control negativo (B) del kit. Por ejemplo, 15 µl de muestra más 135 µl de control negativo para obtener una dilución 10x. Pueden prepararse otras diluciones (p. ej., 100x) a partir de la dilución 10x o de otra forma, según convenga. Algunos sueros no se diluirán de forma lineal.

VALOR DE CORTE DE LA CONCENTRACIÓN DEL ENSAYO

Negativo	<20 u/ml
Positivo	≥20 u/ml

Este valor de corte y el valor de corte basado en el valor de índice han sido validados por RSR. No obstante cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia normales y patológicos para las concentraciones de 3 Screen. También se recomienda que cada laboratorio incluya su propio grupo de muestras de control en el ensayo.

EVALUACIÓN CLÍNICA

Especificidad y sensibilidad clínicas

En un análisis de 1200 sueros de donantes de sangre varones adultos sanos, 1166 (97 %) dieron valores de índice por debajo de 30. Un índice de 30 era equivalente a 20 u/ml. De los 34 sueros que dieron valores de índice de 30 o más, 33 (97 %) fueron positivos en ensayos individuales de detección de autoanticuerpos anti-GAD o anti-IA-2 o anti-ZnT8.

El análisis de sueros de 147 pacientes con DM1 (la mayoría con enfermedad de larga duración) indicó que 126 (86 %) dieron valores de índice de 30 o más con 3 Screen. Se observó una buena concordancia entre los resultados con 3 Screen y los ensayos individuales de detección de autoanticuerpos anti-GAD o anti-IA-2 o anti-ZnT8 (concordancia del 94 %).

Límite inferior de detección

El control negativo se analizó 20 veces y se calcularon la

media y la desviación estándar. El límite de detección inferior con +2 desviaciones estándar fue de 1,3 u/ml, y el valor de índice fue de 8,3.

Precisión intraensayo

Muestra	Media u/ml (n = 25)	CV (%)	Índice medio (n = 25)	CV (%)
1	23	7,9	32	4,0
2	25	4,5	33	2,5
3	38	5,7	42	4,4
4	145	4,6	140	4,1
5	405	4,4	336	3,4

Precisión interensayo

Muestra	Media u/ml (n = 20)	CV (%)	Índice medio (n = 20)	CV (%)
A	71	5,8	72	3,2
B	95	5,1	93	3,0
C	121	4,7	114	3,1
D	192	4,1	167	3,6
E	260	4,8	212	3,5
F	489	3,3	334	2,5
G	1158	3,3	553	3,1

Exactitud clínica

De 108 sueros con enfermedad de Graves, 6 (5,6 %) fueron positivos con 3 Screen (índice ≥ 30). Cinco de estos 6 también fueron positivos para autoanticuerpos anti-GAD o anti-IA-2 o anti-ZnT8 en los ensayos individuales de detección de anticuerpos.

En el caso de la enfermedad de Addison, 3 de cada 10 (30 %) pacientes fueron positivos con 3 Screen (índice ≥ 30), igual que 3 de cada 29 (10 %) sueros de pacientes celíacos y 1 de cada 20 (5 %) sueros de pacientes con artritis reumatoide. Todos los sueros positivos para 3 Screen en estos 3 grupos de pacientes también fueron positivos para autoanticuerpos anti-GAD o anti-IA-2 o anti-ZnT8 en ensayos individuales de detección de anticuerpos.

Interferencia

No se observó ninguna interferencia cuando se añadieron las siguientes sustancias a las muestras: hemoglobina a 500 mg/dl, bilirrubina a 20 mg/dl, intralípidos hasta 3000 mg/dl o biotina a 14 µg/ml.

CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA SEGURIDAD

Estreptavidina-peroxidasa (SA-POD)

Palabra de advertencia: Atención



Indicaciones de peligro:

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia

P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas

antes de volver a usarlas.

Sustrato de peroxidasa (TMB)

Palabra de advertencia: Peligro



Indicaciones de peligro

H360D: Puede perjudicar a la fertilidad o dañar al feto.

Consejos de prudencia

P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P308 + P313: EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

Diluyente para SA-POD

Indicaciones de peligro

EUH208: Contiene 2-cloroacetamida. Puede provocar una reacción alérgica.

Este kit es solo para uso profesional *in vitro*. Seguir cuidadosamente las instrucciones. Respetar las fechas de caducidad indicadas en las etiquetas y el período de validez especificado para los pocillos recubiertos y los reactivos

diluidos o reconstituidos. Consultar la ficha de datos de seguridad para obtener información más detallada sobre la seguridad. El material de origen humano utilizado en la preparación del kit ha sido analizado y ha dado negativo para anticuerpos anti-VIH-1 y 2 y anti-VHC y para HBsAg; no obstante, debe manipularse como potencialmente infeccioso. Lavarse bien las manos si ha habido contaminación y antes de irse del laboratorio. Esterilizar todos los residuos potencialmente contaminados, incluidas las muestras problema, antes de su eliminación. Si bien el material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos, debe manipularse como potencialmente infeccioso. Algunos componentes contienen cantidades pequeñas de azida de sodio como conservante. Evitar la ingestión, la inhalación, la inyección y el contacto con la piel, los ojos y la ropa de todos los componentes del kit. Evitar la formación de azidas de metales pesados en el sistema de desagüe. Para ello, dejar correr agua abundante al aclarar cualquier componente del kit.

PLAN DE ENSAYO

Dejar que todos los reactivos (excepto 3 Screen-biotina y el tampón de reconstitución para 3 Screen-biotina) y los sueros de ensayo alcancen la temperatura ambiente (20–25 °C) antes de su uso		
Día 1	Pipetear:	25 µl de control negativo (B), controles positivos (C1-3), preparación de referencia (D) o calibradores (si se utiliza E1-5) y sueros de ensayo en la placa de ELISA (A) (excepto el blanco)
	Mezclar:	Agitar durante 5 segundos a 500 agitaciones por minuto
	Incubar:	Durante la noche (16–20) horas a 2–8 °C (sin agitar)
Día 2	Aspirar/decantar:	Placa de ELISA (A)
	Lavar:	La placa de ELISA (A) tres veces (secar sobre un material absorbente en caso de lavado manual (F))
	Pipetear:	100 µl de 3 Screen-biotina (G) frío (reconstituido con H) en cada pocillo (A) (excepto el blanco)
	Incubar:	1 hora a 2–8 °C (sin agitar)
	Aspirar/decantar:	Placa de ELISA (A)
	Lavar:	La placa de ELISA (A) tres veces (secar sobre un material absorbente en caso de lavado manual (F))
	Pipetear:	100 µl de SA-POD (J) (diluida 1:20) en cada pocillo (excepto el blanco)
	Incubar:	20 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas a 500 agitaciones/min
	Aspirar/decantar:	Placa de ELISA (A)
	Lavar:	La placa de ELISA (A) tres veces (aclarar una vez más con agua pura y secar sobre un material absorbente en caso de lavado manual(F))
	Pipetear:	100 µl de TMB (L) en cada pocillo (A) (incluido el blanco)
	Incubar:	20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad (sin agitar)
	Pipetear:	100 µl de solución de parada (M) en cada pocillo (incluido el blanco (A)) y agitar durante 5 segundos
Leer la absorbancia a 405 nm y 450 nm en los 10 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.		



3 Screen Islet Cell Autoantibody ELISA Kit - Instructions for use



RSR Limited

Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff CF14 5DU United Kingdom
Tel.: +44 29 2068 9299 Fax: +44 29 2075 7770
Email: info@rsrltd.com Website: www.rsrltd.com

EC REP Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr., Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta.

INTENDED USE

The RSR 3 Screen Islet Cell Autoantibody (3 Screen) ELISA kit is intended for use by professional persons only, for quantitative determination of GAD, IA-2 and ZnT8 autoantibodies (Ab) in human serum.

REFERENCES

- M. Amoroso et al "3 Screen islet cell autoantibody ELISA: A sensitive and specific ELISA for the combined measurement of autoantibodies to GAD65, to IA-2 and to ZnT8." Clin. Chim. Acta. 2016 462:60 - 64
A. G. Ziegler et al "3 Screen ELISA for high-throughput detection of beta cell autoantibodies in capillary blood." Diabetes Technol. Ther. 2016 18:687 - 693

PATENTS

The following patents apply: European patents EP 1 563 071 B1 and EP 2 118 309 B1, Chinese patents CN 1738900 B and ZL 200780051859.3, Indian patents 279741, Japanese patents 4498144 and 5694668 and US patents US 8,129,132 B2, US 7,851,164 B2 and US 9,023,984 B2.

ASSAY PRINCIPLE

In RSR's 3 Screen ELISA, GAD, IA-2 and ZnT8 Ab in patients' sera, reference preparation or calibrators (optional) and controls are allowed to interact with GAD65, IA-2 and ZnT8 coated onto ELISA plate wells. After a 16 - 20 hour incubation, the samples are discarded leaving any GAD, IA-2 and/or ZnT8 Ab in the patient sera, reference preparation or calibrators (optional) and controls bound to the GAD65, IA-2 and ZnT8 coated wells.


ZnT8 Ab to act divalently, a bridge is formed between the GAD65, IA-2 or ZnT8 immobilised on the plate and GAD65-Biotin, IA-2-Biotin and ZnT8-Biotin respectively. Unbound GAD65/IA-2/ZnT8-Biotin is then removed in a wash step and the amount of bound GAD65/IA-2/ZnT8-Biotin determined (in a 3rd incubation step) by addition of Streptavidin Peroxidase (SA-POD), which binds specifically to Biotin. Excess, unbound SA-POD is then washed away and addition of the peroxidase substrate 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB) results in formation of a blue colour. This reaction is stopped by addition of stop solution causing the well contents to turn yellow. The absorbance of the yellow reaction mixture at 450nm and 405nm is then read using an ELISA plate reader. A higher absorbance indicates the presence of GAD, IA-2 and/or ZnT8 Ab in the test sample. Reading at 405nm allows quantitation of high absorbances. It is recommended that low absorbance values are measured at 450nm. If it is possible to read at only one wavelength 405nm may be used.

STORAGE AND PREPARATION OF TEST SERUM SAMPLES

Sera to be analysed should be assayed soon after separation or stored, preferably in aliquots, at or below -20°C. 50 µL is sufficient for one assay (RSR recommends duplicate 25 µL determinations). Repeated freeze thawing or increases in storage temperature should be avoided. Do not use lipaemic or haemolysed serum samples. Do not use plasma in the assay. When required, bring test sera to room temperature and mix gently to ensure homogeneity. Centrifuge sera prior to assay (preferably for 5 min at about 10,000 rpm i.e. about 10,000 g in a microfuge) to remove particulate matter. Please do not omit this centrifugation step if sera are cloudy or contain particulates.

SYMBOLS

Table with 2 columns: Symbol and Meaning. Rows include CE mark (EC Declaration of Conformity), IVD (In Vitro Diagnostic Device), REF (Catalogue Number), LOT (Lot Number), book icon (Consult Instructions), factory icon (Manufactured By), sigma icon (Sufficient for), and hourglass icon (Expiry Date).

	Store
CONTROL -	Negative Control
CONTROL +	Positive Control

MATERIALS REQUIRED AND NOT SUPPLIED

Pipettes capable of dispensing 25µL and 100µL.
Means of measuring out various volumes to reconstitute or dilute reagents.
Pure water.
ELISA Plate reader suitable for 96 well formats and capable of measuring at 450nm and 405nm.
ELISA Plate shaker, capable of 500 shakes/min (not an orbital shaker).
ELISA Plate cover.

PREPARATION OF REAGENTS SUPPLIED

Store unopened kits and all components (A-M) at 2–8°C.

A	3 Screen Coated Wells 12 breakapart strips of 8 wells (96 in total) in a frame and sealed in foil bag. Allow to stand at room temperature (20-25 °C) for at least 30 minutes before opening.
	Ensure wells are firmly fitted into frame provided. After opening return any unused wells to the original foil bag with desiccant provided and seal with adhesive tape. Place foil bag in the self-seal plastic bag and store at 2-8°C for up to 3 months.
B	Negative Control 0.3 mL Ready for use
C1	GADAb Positive Control 0.3 mL Ready for use
C2	IA-2 Ab Positive Control 0.3 mL Ready for use
C3	ZnT8 Ab Positive Control 0.3 mL Ready for use
D	Reference Preparation 0.3 mL Ready for use
E1-5	Calibrators (optional) 5, 15, 100, 400 and 2000 u/mL (units are arbitrary RSR units) 5 x 0.3 mL Ready for use
F	Concentrated Wash Solution 125 mL Concentrated Dilute 10 X with pure water before use. Store at 2-8°C up to kit expiry.
G	3 Screen-Biotin 3 vials Lyophilised

	Immediately before use reconstitute each vial with 5.5 mL of reconstitution buffer for 3 Screen-Biotin (H). When more than one vial is used, pool and mix gently before use.
H	Reconstitution Buffer for 3 Screen-Biotin 2 x 15 mL Coloured red Ready for use
J	Streptavidin Peroxidase (SA-POD) 0.7 mL Concentrated
	Dilute 1 in 20 with diluent for SA-POD (K). For example, 0.5mL (J) + 9.5mL (K). Store at 2–8°C for up to 28 weeks after dilution.
K	Diluent for SA-POD 15 mL Ready for use
L	Peroxidase Substrate (TMB) 15 mL Ready for use
M	Stop Solution 12 mL Ready for use

ASSAY PROCEDURE

Allow all reagents and test sera to stand at room temperature (20-25°C) for at least 30 minutes before use except 3 Screen-Biotin and reconstitution buffer for 3 Screen-Biotin. A repeating Eppendorf type pipette is recommended for steps 4, 7, 10 and 11.

Day 1	1.	Pipette 25 µL of negative control (B), positive controls (C1–3), reference preparation (D) or (if used) calibrators (E1-5) and patients' sera into respective wells (A), (in duplicate is recommended), leaving one well empty for blank (see step 12).
	2.	Cover the frame and shake for approximately 5 seconds on an ELISA plate shaker (500 shakes per min) and incubate at 2–8°C (without shaking) overnight (16-20 hours)
Day 2	3.	Use an ELISA plate washer to aspirate and wash the plate 3 times with diluted wash solution (F). If a plate washer is not available, discard the well contents by briskly inverting the frame of wells over a suitable receptacle, wash the wells 3 times manually and finally tap the inverted wells gently on a clean dry absorbent surface.
	4.	Pipette 100 µL of cold reconstituted 3 Screen-Biotin (G) into each well (except blank). Avoid splashing the material out of the wells during addition.
	5.	Cover the frame, and incubate at 2-8°C for 1 hour (without shaking).
	6.	Repeat wash step 3.
	7.	Pipette 100 µL of diluted SA-POD (J) into each well (except blank).

Day 2 continued	8.	Cover the frame and incubate at room temperature (20-25°C) for 20 minutes on an ELISA plate shaker (500 shakes per min).
	9.	Repeat wash step 3. If manual washing is being carried out use one additional wash step with pure water (to remove any foam) before finally tapping the inverted wells dry.
	10.	Pipette 100 µL of TMB (L) into each well (including blank) and incubate in the dark at room temperature (20-25°C) for 20 minutes without shaking.
	11.	Pipette 100 µL stop solution (M) into each well (including blank) cover the frame and shake for approximately 5 seconds on a plate shaker (500 shakes per min). Ensure substrate incubations are the same for each well.
	12.	Within 10 minutes, read the absorbance of each well at 405nm and then 450 nm using an ELISA plate reader, blanked against a well containing 100 µL of TMB (L) and 100 µL stop solution (M) only.

RESULT ANALYSIS

Calculation of results without calibrators

Index Calculation

The index values are calculated as follows:

$$\text{Index} = \frac{\text{test sample absorbance at 450nm}}{\text{reference preparation absorbance at 450nm}} \times 100$$

The index value can also be calculated using absorbance data at 405nm

97% of 1200 healthy adult male blood donor sera gave index values of less than 30 suggesting that index values of 30 or more could be considered positive in this group (see page 4).

TYPICAL RESULTS (Example only; not to be used for calculation of actual results)

	A450 nm	Index value	A405 nm	Index value
Reference Preparation (D)	0.547	100	0.173	100
Negative Control (B)	0.036	6.6	0.013	7.5
Positive Control (C1)	1.200	219	0.379	219
Positive Control (C2)	0.485	89	0.154	89
Positive Control (C3)	0.235	43	0.075	43

ASSAY INDEX VALUE CUT OFF

Negative	< 30
Positive	≥ 30

Calculation of results with calibrators

A calibration curve can be established by plotting calibrator concentration on the x-axis (log scale) against the absorbance of the calibrators on the y-axis (linear scale). The GAD, IA-2 and/or ZnT8 Ab

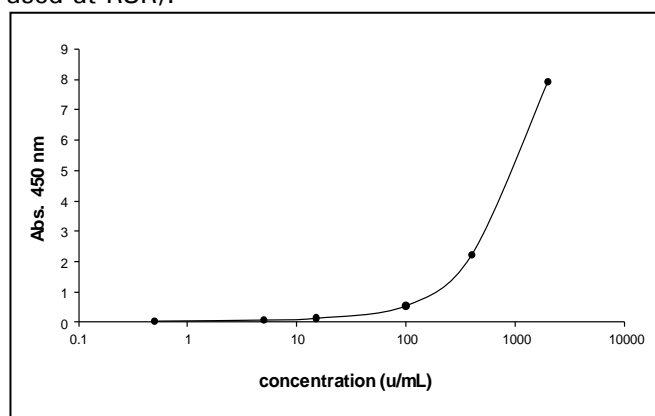
concentrations in patients' sera can then be read off the calibration curve [plotted at RSR as a spline log/lin curve (smoothing factor = 0)]. Other data reduction methods can be used. The negative control (B) has a concentration of 0 u/mL, but can be assigned a value of 0.5 u/mL to facilitate computer processing of data.

TYPICAL RESULTS (Example only; not to be used for calculation of actual results)

	A450 nm	Conc. u/mL	A405 nm	Conc. u/mL
Negative Control (B)	0.036	0	0.013	0
E1	0.072	5	0.023	5
E2	0.130	15	0.041	15
E3	0.539	100	0.170	100
E4	2.212	400	0.701	400
E5	7.929*	2000	2.332	2000
Positive Control (C1)	1.200	226	0.379	219
Positive Control (C2)	0.485	89	0.154	90
Positive Control (C3)	0.235	39	0.075	42

*derived from 405nm value

For absorbance readings at 450nm above 3.0, the absorbance reading at 405nm can be converted to 450nm absorbance values by multiplying by the appropriate factor (3.4 in the case of equipment used at RSR).



Samples with high GAD, IA-2 and/or ZnT8 Ab concentrations can be diluted in kit negative control (B). For example, 15 µL of sample plus 135 µL of negative control to give a 10x dilution. Other dilutions (e.g. 100x) can be prepared from a 10x dilution or otherwise as appropriate. Some sera will not dilute in a linear way.

ASSAY CONCENTRATION CUT OFF

Negative	< 20 u/mL
Positive	≥ 20 u/mL

This cut off and the cut off based on index value has been validated at RSR. However each laboratory should establish its own normal and pathological reference ranges for 3 Screen. Also it is recommended that each laboratory include its own panel of control samples in the assay.

CLINICAL EVALUATION

Clinical Specificity and Sensitivity

In an analysis of 1200 healthy adult male blood donor sera 1166 (97%) gave index values of less than 30. An index of 30 was equivalent to 20 u/mL. Out of the 34 sera giving index values of 30 or greater, 33 (97%) were positive in individual assays for GADAb and/or IA-2 Ab and/or ZnT8 Ab.

Analysis of sera from 147 patients with type 1 DM (mostly with longstanding disease) indicated that 126 (86%) gave 3 Screen index values of 30 or more. There was good agreement between 3 Screen results and individual assays for GADAb and/or IA-2 Ab and/or ZnT8 Ab (concordance 94%).

Lower Detection Limit

The negative control was assayed 20 times and the mean and standard deviation calculated. The lower detection limit at +2 standard deviations was 1.3 u/mL, the index value was 8.3.

Intra Assay Precision

Sample	Mean u/mL (n=25)	CV (%)	Mean index (n=25)	CV (%)
1	23	7.9	32	4.0
2	25	4.5	33	2.5
3	38	5.7	42	4.4
4	145	4.6	140	4.1
5	405	4.4	336	3.4

Inter Assay Precision

Sample	Mean u/mL (n=20)	CV (%)	Mean index (n=20)	CV (%)
A	71	5.8	72	3.2
B	95	5.1	93	3.0
C	121	4.7	114	3.1
D	192	4.1	167	3.6
E	260	4.8	212	3.5
F	489	3.3	334	2.5
G	1158	3.3	553	3.1

Clinical Accuracy

Out of 108 sera with Graves' disease, 6 (5.6%) were 3 Screen positive (index \geq 30). 5 of the 6 were also positive for GADAb and/or IA-2 Ab and/or ZnT8 Ab in individual Ab assays.

In the case of Addison's disease, 3 out of 10 (30%) of patients were 3 Screen positive (index \geq 30) as were 3 out of 29 (10%) coeliac disease sera and 1 out of 20 (5%) sera from patients with rheumatoid arthritis. All 3 Screen positive sera in these 3 patient groups were also positive for GADAb and/or IA-2 Ab and/or ZnT8 Ab in individual Ab assays.

Interference

No interference was observed when samples were spiked with the following materials: haemoglobin at 500 mg/dL, bilirubin at 20 mg/dL, Intralipid up to 3000 mg/dL or Biotin at 14 μ g/mL.

SAFETY CONSIDERATIONS

Streptavidin Peroxidase (SA-POD)

Signal word: Warning



Hazard statement(s)

H317: May cause an allergic skin reaction

Precautionary statement(s)

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection

P302 + P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water

P333 + P313: If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention

P362 + P364: Take off contaminated clothing and wash it before reuse

Peroxidase Substrate (TMB)

Signal word: Danger



Hazard statement(s)

H360: May damage fertility or the unborn child

Precautionary statement(s)

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection

P308 + P313: IF exposed or concerned: Get medical advice/attention

Diluent for SA-POD

Hazard statement(s)

EUH208: Contains 2-Chloroacetamide. May produce an allergic reaction.

This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Follow the instructions carefully. Observe expiry dates stated on the labels and the specified shelf life for coated wells, reconstituted and diluted reagents. Refer to Safety Data Sheet for more detailed safety information. Material of human origin used in the preparation of the kit has been tested and found non reactive for HIV1 and 2 and HCV antibodies and HBsAg but should, none-the-less, be handled as potentially infectious. Wash hands thoroughly if contamination has occurred and before leaving the laboratory. Sterilise all potentially contaminated waste, including test specimens before disposal. Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy but these materials should be handled as potentially infectious. Some components contain small quantities of sodium azide as preservative. With all kit components, avoid ingestion, inhalation, injection and contact with skin, eyes and clothing. Avoid formation of heavy metal azides in the drainage system by flushing any kit component away with copious amounts of water.

ASSAY PLAN

Allow all reagents (except 3 Screen-Biotin and reconstitution buffer for 3 Screen-Biotin) and test sera to reach room temperature (20-25°C) before use

Day 1	Pipette:	25 µL negative and positive controls (B and C1-3), reference preparation (D) or calibrators (if used E1-5) and test sera into ELISA plate (A) (except blank)
	Mix:	Shake for 5 seconds at 500 shakes/min
	Incubate:	Overnight (16-20) hours at 2–8°C (without shaking)
Day 2	Aspirate/Decant:	ELISA plate (A)
	Wash:	ELISA plate (A) three times (dry on absorbent material for manual wash (F))
	Pipette:	100 µL cold 3 Screen-Biotin (G) (reconstituted with (H)) into each well (A) (except blank)
	Incubate:	1 hour at 2–8°C (without shaking)
	Aspirate/Decant:	ELISA plate (A)
	Wash:	ELISA plate (A) three times (dry on absorbent material for manual wash (F))
	Pipette:	100 µL SA-POD (J) (diluted 1:20) into each well (except blank)
	Incubate:	20 minutes at room temperature with shaking at 500 shakes/min
	Aspirate/Decant:	ELISA plate (A)
	Wash:	ELISA plate (A) three times, (additional rinse with pure water and dry on absorbent material for manual wash (F))
	Pipette:	100 µL TMB (L) into each well (A) (including blank)
	Incubate:	20 minutes at room temperature in the dark (without shaking)
	Pipette:	100 µL stop solution (M) into each well (including blank (A)) and shake for 5 seconds
	Read absorbance at 405nm and 450nm within 10 minutes of addition of stop solution	