



FICHA TÉCNICA PRODUCTO

| <i>Descripción producto</i> | <i>Código Menarini</i> | <i>Fabricante</i> | <i>Código Fabricante</i> |
|-----------------------------|------------------------|-------------------|--------------------------|
| IA2 AB ELISA KIT | 30649 | RSR LTD. | IAE/96/V2 |



ElisaRSR™ IA-2 Ab Version 2

Kit para ELISA de autoanticuerpos
anti-IA-2 (versión 2) - 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



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

USO PREVISTO

El kit para ELISA de autoanticuerpos anti-IA-2 (IA-2 Ab, del inglés *IA-2 autoantibody*) (versión 2) de RSR es solo para uso profesional y está previsto para la determinación cuantitativa de IA-2 Ab 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), el antígeno de células de los islotes IA-2 o ICA-512 y el transportador de zinc 8 (ZnT8).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

S. Chen *et al.* Sensitive non isotopic assays for autoantibodies to IA-2 and to a combination of both IA-2 and GAD₆₅. *Clinica Chimica Acta* (2005) **357**: 74-83.

E. Nilsson *et al.* Calcium addition to EDTA plasma eliminates falsely positive results in the RSR GADAb ELISA. *Clinica Chimica Acta* (2008) **388**: 130-134.

K. Rahmati *et al.* A Comparison of Serum and EDTA Plasma in the Measurement of Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodies (GADA) and Autoantibodies to Islet Antigen-2 (IA-2A) Using the RSR Radioimmunoassay (RIA) and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kits. *Clin. Lab.* (2008) **54**: 227-235.

C. Törn *et al.* Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia* (2008) **51**: 846-852.

PATENTES

Se aplican las siguientes patentes:

Patentes estadounidenses US 8,129,132 B2 y US 10,488,410 B2.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

En el ensayo ELISA para la determinación de IA-2 Ab de RSR (versión 2) se deja que los autoanticuerpos anti-IA-2 en los sueros de los pacientes, los calibradores y los controles interactúen con la IA-2 que recubre los pocillos de la placa de ELISA. Tras incubar durante 16–20 horas, se desechan las muestras dejando los IA-2 Ab unidos a la IA-2 que recubre los pocillos. En un segundo paso de incubación, se añade IA-2-biotina y, debido a la capacidad de los IA-2 Ab de actuar de forma bivalente, se forma un puente entre la IA-2 inmovilizada en la placa y la IA-2-biotina. A

continuación, en un tercer paso de incubación, se determina la cantidad de IA-2-biotina. Para ello, se añade 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 cambie de color azul a amarillo. Por último, se lee la absorbancia de la mezcla de reacción amarilla a 405 nm y a 450 nm mediante un lector de placas de ELISA. Una mayor absorbancia indica la presencia de IA-2 Ab en la muestra problema. La lectura a 405 nm permite la determinación cuantitativa de absorbancias altas (y debe utilizarse para concentraciones de 120 u/ml o superiores). Se recomienda leer los valores bajos (inferiores a 35 u/ml) en la curva de calibración de 450 nm. Si solo es posible leer a una longitud de onda, podría utilizarse la longitud de 405 nm. El intervalo de medición es de 7,5–4000 u/ml (unidades NIBSC 97/550).








CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROBLEMA DE SUERO

Los sueros a examinar deben analizarse poco después de su separación o conservarse, preferiblemente en partes alícuotas, a una temperatura de –20 °C o inferior. La cantidad de 100 µl es suficiente para un ensayo (determinaciones de 50 µl 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. En los estudios en los que se añadieron sueros positivos para IA-2 Ab a muestras de plasma con EDTA, citrato y heparina, se observaron cambios menores en la señal en comparación con el suero añadido del mismo donante. En particular, los valores de absorbancia a 450 nm con los plasmas con EDTA, citrato y heparina enriquecidos fueron del 84–112 % del suero añadido (8 muestras con concentraciones de suero de entre 2,3 u/ml y 505 u/ml) o del 81–114 % en términos de u/ml.

Cuando se requiera, dejar que los sueros problema alcancen la temperatura ambiente y mezclar con cuidado para asegurar la homogeneidad. Centrifugar el suero 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> utilizaciones |
|  | Fecha de caducidad |
|  | Limitación de temperatura |
|  | Control negativo |
|  | Control positivo |

MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

Pipetas para dispensar 25 µl, 50 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).

Tapa para placas de ELISA.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS SUMINISTRADOS

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

| | |
|--------------|---|
| A | Pocillos recubiertos con IA-2 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 usar 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 16 semanas. |
| B | Control negativo 0,7 ml Listo para usar |
| C 1–5 | Calibradores 7,5, 35, 120, 350, 4000 u/ml (unidades NIBSC 97/550) 5 × 0,7 ml Listos para usar |
| D | Control positivo (ver la etiqueta para conocer el intervalo de concentración) 0,7 ml Listo para usar |
| E | Potenciador de reacción 4 ml, color rojo Listo para usar |
| F | Solución de lavado concentrada 125 ml |

| | |
|----------|--|
| | Concentrada Diluir 10x con agua pura antes de usar. Conservar a 2–8 °C hasta la fecha de caducidad del kit. |
| G | IA-2-biotina 3 viales Liofilizada Inmediatamente antes del uso, reconstituir con el volumen de tampón de reconstitución frío de IA-2-biotina (H) indicado en la etiqueta. Si se va a utilizar más de un vial, agruparlos y mezclar con cuidado antes de utilizarlos. |
| H | Tampón de reconstitución de IA-2-biotina 2 × 15 ml, color azul 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 20 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, excepto la IA-2-biotina (G) y el tampón de reconstitución de IA-2-biotina (H), a temperatura ambiente (20–25 °C) durante al menos 30 minutos antes de utilizarlos. No reconstituir la IA-2-biotina hasta el paso 5 indicado más abajo. Se recomienda utilizar una pipeta de repetición de tipo Eppendorf en los pasos 2, 5, 8, 10 y 11.

| | | |
|--------------|-----------|---|
| Día 1 | 1. | Pipetear 50 µl de control negativo (B), calibradores (C1–5), control positivo (D) y sueros de los pacientes en los pocillos correspondientes (A), por duplicado, dejando un pocillo vacío para el blanco (ver el paso 12). |
| | 2. | Pipetear 25 µl de potenciador de reacción (E) en cada pocillo (excepto el blanco). |
| | 3. | Tapar el marco de soporte y agitar los pocillos durante 5 segundos a 500 agitaciones por minuto. A continuación, incubar durante la noche, sin agitar, durante 16–20 horas a 2–8 °C. |
| Día 2 | 4. | 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. |
| | 5. | Pipetear 100 µl de IA-2-biotina (G) fría reconstituida en cada pocillo (excepto el blanco). Evitar que el material salpique fuera de los pocillos durante la adición. |
| | 6. | Tapar el marco de soporte e incubar a 2-8 °C durante 1 hora sin agitar. |
| | 7. | Repetir el paso 4 de lavado. |
| | 8. | Pipetear 100 µl de SA-POD (J) diluida en cada pocillo (excepto el blanco) e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos en un agitador de placas de ELISA (500 agitaciones por minuto). |
| | 9. | Repetir el paso 4 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. |
| Día 2 (continuación) | 10. | Pipetear 100 µl de TMB (L) en cada pocillo (incluido el blanco) e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente 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 minuto). Hay que asegurarse de que las incubaciones con el sustrato sean las mismas para cada uno de los pocillos. |
| | 12. | Mediante un lector de placas de ELISA y utilizando como blanco el pocillo que contiene únicamente 100 µl de TMB (L) y 100 µl de solución de parada (M) , leer inmediatamente la absorbancia de cada pocillo a 405 nm y luego a 450 nm si se utiliza el calibrador de 4000 u/ml, o leer en los 5 minutos posteriores si este se ha excluido. |

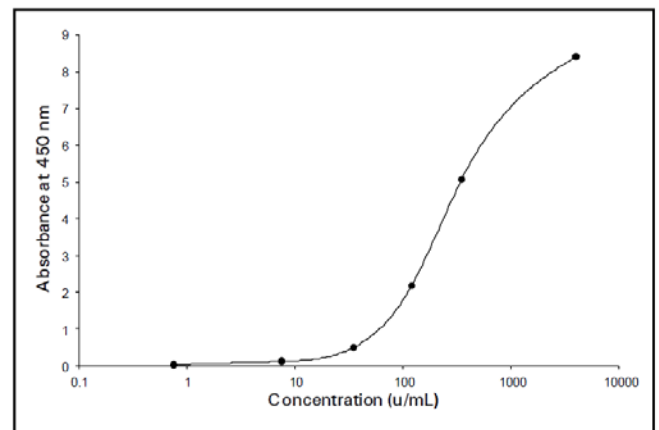
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

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 pueden leer las concentraciones de IA-2 Ab en los sueros de los pacientes a partir de la curva de calibración (representada en RSR en forma de curva *spline* semilogarítmica [factor de ajuste = 0]). Se pueden utilizar otros sistemas de reducción de datos. Al control negativo (B) se le puede asignar un valor de 0,75 u/ml para facilitar el tratamiento informático de los resultados del ensayo. Muchos sueros problema tendrán valores inferiores a 350 u/ml, por lo que no siempre será necesario incluir el calibrador de 4000 u/ml. Las muestras con una concentración elevada de IA-2 Ab pueden diluirse con el control negativo del kit (B). 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.

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) | 0,027 | 0 | 0,013 | 0 |
| C1 | 0,116 | 7,5 | 0,041 | 7,5 |
| C2 | 0,494 | 35 | 0,148 | 35 |
| C3 | 2,170 | 120 | 0,649 | 120 |
| C4 | 5,083 | 350 | 1,495 | 350 |
| C5 | 8,408 | 4000 | 2,473 | 4000 |
| Control positivo (D) | 2,198 | 122 | 0,655 | 121 |

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



VALOR DE CORTE DEL ENSAYO

| | |
|-----------------|-----------|
| Negativo | <7,5 u/ml |
| Positivo | ≥7,5 u/ml |

Este valor de corte ha sido validado por RSR. No obstante, cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia normales y patológicos para las concentraciones de IA-2 Ab. También se recomienda que cada laboratorio incluya su propio grupo de muestras de control en el ensayo.

EVALUACIÓN CLÍNICA

Especificidad y sensibilidad clínicas

En el estudio IASP 2016, el kit para ELISA de autoanticuerpos anti-IA-2 de RSR (versión 2) alcanzó una especificidad del 98 % ($n = 90$) y una sensibilidad del 76 % ($n = 50$).

Se analizaron los sueros de 533 donantes de sangre sanos con el kit para ELISA de IA-2 Ab de RSR (versión 2), de los cuales 523 (98,1 %) dieron negativo (por debajo del valor de corte de 7,5 u/ml) para IA-2 Ab.

Límite inferior de detección

El control negativo del kit se analizó 20 veces y se calcularon la media y la desviación estándar. El límite inferior de detección con +2 desviaciones estándar fue de

0,95 u/l.

Precisión interensayo

| Muestra | u/ml (n = 20) | CV (%) |
|---------|---------------|--------|
| 1 | 41 | 4,5 |
| 2 | 140 | 4,2 |

Precisión intraensayo

| Muestra | u/ml (n = 25) | CV (%) |
|---------|---------------|--------|
| A | 12 | 3,1 |
| B | 41 | 1,3 |
| C | 80 | 1,6 |
| D | 296 | 2,1 |
| E | 6,1 | 2,1 |

Exactitud clínica

El análisis de los sueros de los pacientes con enfermedades autoinmunitarias distintas de la DM1 no mostró ninguna interferencia de los autoanticuerpos antirreceptor de TSH (n = 19). El 5 % (n = 20) de los sueros positivos para autoanticuerpos contra la tiroglobulina y la peroxidasa tiroidea y el 5 % (n = 20) de los sueros positivos para el factor reumatoide dieron positivo para IA-2 Ab con el kit para ELISA de autoanticuerpos anti-IA-2 de RSR (versión 2). Estos sueros también fueron positivos en el kit para ELISA de autoanticuerpos anti-GAD de RSR.

Interferencia

No se observó ninguna interferencia cuando se añadieron las siguientes sustancias a las muestras: bilirrubina a 20 mg/dl y biotina hasta 14 µg/ml. Se observó interferencia con hemoglobina e intralípidos.

CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA SEGURIDAD

Estreptavidina-peroxidasa (SA-POD) y potenciador de reacción

Palabra de advertencia: Atención



Indicaciones de peligro

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia

P261: Evitar respirar la niebla/los vapores.

P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.

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.

P501: Eliminar el contenido/el recipiente en un punto de recogida de residuos peligrosos o especiales, de acuerdo

PLAN DE ENSAYO

| | | |
|-------|---|--|
| Día 1 | Dejar reposar todos los reactivos y las muestras, excepto la IA-2-biotina (G) y el tampón de reconstitución de IA-2-biotina (H), a temperatura ambiente (20–25 °C) antes de utilizarlos | |
| | Pipetear: | 50 µl de control negativo (B), calibradores (C1–5), control positivo (D) y sueros de los pacientes (excepto el blanco) |
| | Pipetear: | 25 µl de potenciador de reacción (E) (excepto el blanco) |
| | Mezclar: | Agitar en un agitador de placas de ELISA a 500 agitaciones/min durante 5 segundos |

con las normas locales, regionales, nacionales y/o internacionales.

Sustrato de peroxidasa (TMB)

Palabra de advertencia: Peligro

Indicaciones de peligro



H360D: Puede dañar al feto.

Consejos de prudencia

P202: No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.

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

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

P501: Eliminar el contenido/el recipiente en un punto de recogida de residuos peligrosos o especiales, de acuerdo con las normas locales, regionales, nacionales y/o internacionales.

Diluyente para SA-POD

Indicaciones de peligro

EUH 208: 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.

| | | |
|-------|---|---|
| | Incubar: | Durante la noche (16–20 horas) 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) |
| | Pipetear: | 100 µl de IA-2-biotina (G) fría (reconstituida con tampón de reconstitución [H] frío) en cada pocillo (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) |
| | Pipetear: | 100 µl de SA-POD (J) (diluida 1:20) en cada pocillo (excepto el blanco) |
| Día 2 | Incubar: | 20 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas de ELISA 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) |
| | Pipetear: | 100 µl de TMB (L) en cada pocillo (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) y agitar durante 5 segundos |
| | Leer la absorbancia inmediatamente a 405 nm y luego a 450 nm si se utiliza el calibrador de 4000 u/ml, o en los 5 minutos posteriores si este se excluye. | |
| | No es necesario golpear suavemente las placas para secarlas tras el lavado si se utiliza un lavador de placas automático. Asimismo, el lavado con agua pura puede omitirse en el último paso de lavado si se utiliza un lavador automático. | |