

Kit para ELISA de autoanticuerpos antidescarboxilasa del ácido glutámico (GAD) de RSR – 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-GAD₆₅ (GADAb, del inglés *glutamic acid decarboxylase autoantibody*) de RSR es solo para uso profesional y está previsto para la determinación cuantitativa de GADAb 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

H. Brooking *et al.* A Sensitive non-isotopic assay for GAD₆₅ autoantibodies. *Clinica Chimica Acta* 2003 **331**:55-59

S. Chen *et al.* Sensitive non-isotopic assays for autoantibodies to IA2 and to a combination of both IA2 and GAD65. *Clinica Chimica Acta* 2005 **357**:74-83

E. Nilson *et al.* Calcium addition to EDTA plasma eliminates falsely positive results in the RSR GADAb ELISA. *Clinica Chimica Acta* 388 (2008) 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 10,481,156 B2.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

En el ensayo ELISA para la determinación de GADAb

de RSR, se deja que los autoanticuerpos anti-GAD en los sueros de los pacientes, los calibradores y los controles interactúen con la GAD₆₅ que recubre los pocillos de la placa de ELISA. Tras incubar durante 1 hora, se desechan las muestras dejando los GADAb unidos a la GAD₆₅ inmovilizada en la placa. En un segundo paso de incubación, se añade GAD₆₅-biotina y, debido a la capacidad de los GADAb en las muestras de actuar de forma bivalente, se forma un puente entre la GAD₆₅ inmovilizada en la placa y la GAD₆₅-biotina. A continuación, en un tercer paso de incubación, se determina la cantidad de GAD₆₅-biotina unida. Para ello, se añade estreptavidina-peroxidasa, que se une específicamente a la biotina. Luego se elimina el exceso de estreptavidina-peroxidasa que no se ha unido y se añade 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 a 405 nm mediante un lector de placas de ELISA. Una mayor absorbancia indica la presencia de GADAb en la muestra problema. La lectura a 405 nm permite la determinación cuantitativa de absorbancias altas (y debe utilizarse para concentraciones de 120 μ /ml o superiores). Los valores bajos (inferiores a 10 μ /ml) deben leerse 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 5–2000 μ /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 50 μ l es suficiente para un ensayo (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 el suero antes del ensayo (preferiblemente durante 5 min a 10–15 000 r.p.m. 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
IVD	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
REF	Número de catálogo
LOT	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 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 los componentes a una temperatura de 2–8 °C.

A	Pocillos recubiertos con GAD₆₅ 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 16 semanas.
B1–6	Calibradores 5, 18, 35, 120, 250, 2000 µ/ml (unidades NIBSC 97/550) 6 × 0,7 ml Listos para utilizar
C	Control positivo (ver la etiqueta para conocer el intervalo de concentración) 0,7 ml Listo para utilizar
D	Control negativo 0,7 ml

	Listo para utilizar
E	GAD₆₅-biotina: 3 viales Liofilizada
	Reconstituir cada vial con 5,5 ml de tampón de reconstitución de GAD-biotina (F). Si se va a utilizar más de un vial, agruparlos y mezclar con cuidado antes de utilizarlos. Conservar a 2–8 °C durante un máximo de 3 días tras la reconstitución.
F	Tampón de reconstitución de GAD₆₅-biotina 2 × 15 ml, color rojo Listo para utilizar
G	Estreptavidina-peroxidasa (SA-POD) 1 × 0,7 ml Concentrada
	Diluir 1:20 con diluyente para SA-POD (H). Por ejemplo, 0,5 ml (G) + 9,5 ml (H). Conservar a 2–8 °C durante un máximo de 16 semanas tras la dilución.
H	Diluyente para SA-POD: 15 ml Listo para utilizar
I	Sustrato de peroxidasa (TMB) 15 ml Listo para utilizar
J	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.
K	Solución de parada 12 ml Lista para utilizar

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

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

1.	Pipetear 25 µl de sueros de los pacientes, calibradores (B1–6) y controles (C y D) en los pocillos correspondientes (se recomienda hacerlo por duplicado), dejando un pocillo vacío para el blanco (ver el paso 12).
2.	Tapar el marco de soporte y agitar los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas de ELISA (500 agitaciones por minuto).
3.	Utilizar un lavador de placas de ELISA para aspirar y lavar los pocillos tres veces con solución de lavado (J) 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 tres veces de forma manual y, finalmente, golpear suavemente los pocillos invertidos sobre una superficie absorbente

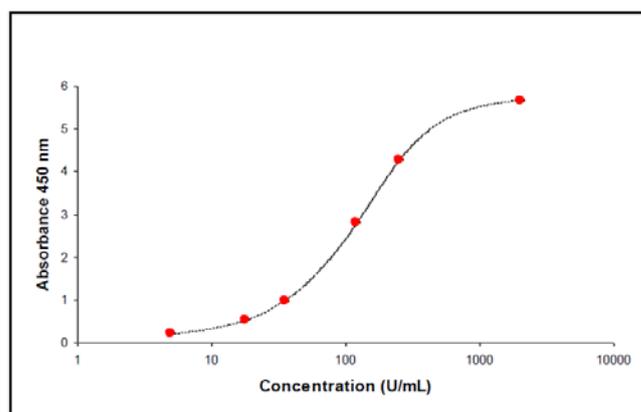
	limpia y seca.
4.	Pipetear 100 µl de GAD ₆₅ -biotina (E) reconstituido en cada pocillo (excepto el blanco). Evitar que el material salpique fuera de los pocillos durante la adición.
5.	Tapar el marco de soporte e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de placas de ELISA (500 agitaciones por minuto).
6.	Repetir el paso 3 de lavado.
7.	Pipetear 100 µl de SA-POD (G) diluida en cada pocillo (excepto el blanco).
8.	Tapar el marco de soporte e incubar a temperatura ambiente 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 (I) 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 (K) en cada pocillo (incluido el blanco). Tapar el marco de soporte y agitar durante unos 5 segundos en un agitador de placas. Hay que asegurarse de que las incubaciones con el sustrato sean las mismas para cada uno de los pocillos.
12.	Al cabo de 15 minutos, leer la absorbancia de cada pocillo a 450 nm y 405 nm con un lector de placas de ELISA, utilizando como blanco el pocillo que contiene únicamente 100 µl de TMB (I) y 100 µl de solución de parada (K).

NIBSC 97/550).

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

Calibrador	Abs. 450 nm	Conc. µ/ml	Abs. 405 nm	Conc. µ/ml
B1	0,199	5	0,061	5
B2	0,527	18	0,164	18
B3	0,975	35	0,301	35
B4	2,794	120	0,843	120
B5	4,264	250	1,254	250
B6	5,671	2000	1,668	2000
Control negativo (D)	0,035	0	0,012	0
Control positivo (C)	1,374	49,2	0,418	49,6

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).



Absorbancia 450 nm
Concentración (µ/ml)

VALOR DE CORTE DEL ENSAYO

Valor de corte	µ/ml
negativo	<5 µ/ml
positivo	≥5 µ/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 GADAb. 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 DASP 2005, el kit para ELISA de autoanticuerpos anti-GAD de RSR alcanzó una especificidad del 98 % (n = 100) y una sensibilidad del 92 % (n = 50).

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

0,57 µ/l.

Precisión interensayo

Muestra	µ/ml (n = 20)	CV (%)
A	97	5,7
B	21	5,2
C	5,7	6,4

Precisión intraensayo

Muestra	µ/ml (n = 25)	CV (%)
1	97	7,3
2	20	8,5
3	7,0	3,5

Exactitud clínica

El análisis de los sueros de los pacientes con enfermedades autoinmunitarias distintas de la DM1 no mostró interferencia de los autoanticuerpos contra la tiroglobulina o la peroxidasa tiroidea (n = 10) o el receptor de TSH (n = 20). Una muestra positiva para ADNc (n = 10) y una muestra positiva para factor reumatoide (n = 30) dieron positivo para GADAb.

Interferencia

No se observó ninguna interferencia cuando se añadieron las siguientes sustancias a las muestras: hemoglobina a 5 mg/ml, bilirrubina a 20 mg/dl o intralípidos hasta 3000 mg/dl.

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

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 abundante agua y jabón.

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

P362 + P364: Quitar 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 con la normativa local, regional, nacional y/o internacional.

Sustrato de peroxidasa (TMB)

Palabras 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 la normativa local, regional, nacional y/o internacional.

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 o 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 reposar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20–25 °C) antes de utilizarlos



Pipetear:	25 µl de calibradores (B1–6), controles (C y D) y sueros de los pacientes (excepto el blanco)
Incubar:	1 hora 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 y secar golpeando suavemente sobre un material absorbente ¹
Pipetear:	100 µl de GAD ₆₅ -biotina (E) (reconstituida) en cada pocillo (excepto el blanco)
Incubar:	1 hora 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 y secar golpeando suavemente sobre un material absorbente ¹
Pipetear:	100 µl de SA-POD (G) (diluida 1:20) en cada pocillo (excepto el blanco)
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 con agua pura y secar golpeando suavemente sobre un material absorbente ¹
Pipetear:	100 µl de TMB (I) en cada pocillo (incluido el blanco)
Incubar:	20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad (sin agitar)
Pipetear:	100 µl de solución de parada (K) en cada pocillo (incluido el blanco) y agitar durante 5 segundos
Leer la absorbancia a 450 nm y 405 nm en los 15 minutos posteriores a la adición de la solución de parada	
¹ No es necesario golpear suavemente las placas para secarlas tras el lavado si se utiliza un lavador de placas automático. El lavado con agua pura puede omitirse si se utiliza un lavador automático.	