



FICHA TÉCNICA PRODUCTO

<i>Descripción producto</i>	<i>Código Menarini</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Código Fabricante</i>
ZnT8 RECEPTOR ELISA	29752	RSR LTD.	ZNT8/96

**Kit para ELISA de autoanticuerpos antitransportador de zinc 8 (ZnT8) -****Instrucciones de uso****RSR Limited**

Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff

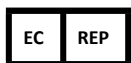
CF14 5DU Reino Unido

Tel.: +44 29 2068 9299

Fax: +44 29 2075 7770

Correo electrónico: info@rsrltd.com

Sitio web: www.rsrltd.com

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

El kit para ELISA de autoanticuerpos anti-ZnT8 (ZnT8 Ab, del inglés *ZnT8 autoantibody*) de RSR es solo para uso profesional y está previsto para la determinación cuantitativa de ZnT8 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). Los anticuerpos anti-ZnT8 se dirigen principalmente contra el dominio carboxiterminal de ZnT8 (residuos 268–369). El polimorfismo genético de la población humana en el codón correspondiente al aminoácido 325 da lugar a la expresión de tres variantes de proteínas: arginina (R) 325, triptófano (W) 325 y, muy raramente, glutamina (Q) 325. Los anticuerpos anti-ZnT8 pueden ser específicos para las variantes R 325 o W 325, o bien inespecíficos para el residuo 325. Los sueros que solo reaccionan con el alelo Q son rarísimos. El ensayo ELISA para la determinación de ZnT8 Ab de RSR es capaz de detectar y cuantificar autoanticuerpos específicos para las variantes R 325 o W 325, o bien inespecíficos para el residuo 325.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

J. M. Wenzlau *et al.* The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *PNAS* 2007 **104**:17040-17045

P. Achenbach *et al.* Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia* 2009 **52**:1881-1888

J. M. Wenzlau *et al.* Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 **95**:4712-4719

L. Petruzelkova *et al.* The dynamic changes of zinc transporter 8 autoantibodies in Czech children for the onset of type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2014 **31**:165-171

G. Dunseath *et al.* Bridging-type enzyme-linked immunoassay for zinc transporter 8 autoantibody measurements in adult patients with diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta.* 2015 **447**:90-95

PATENTES

Se aplican las siguientes patentes:

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

PRINCIPIO DEL ENSAYO










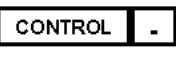

En el ensayo ELISA para la determinación de ZnT8 Ab de RSR se deja que los autoanticuerpos anti-ZnT8 en los sueros de los pacientes, los calibradores y los controles interactúen con el ZnT8 que recubre los pocillos de la placa de ELISA. Tras incubar durante 16–20 horas, se desechan las muestras dejando los ZnT8 Ab unidos al ZnT8 que recubre los pocillos. En un segundo paso de incubación, se añade ZnT8-biotina y, debido a la capacidad de los ZnT8 Ab en las muestras de actuar de forma bivalente (o polivalente), se forma un puente entre el ZnT8 unido a los pocillos y el ZnT8-biotina. A continuación, en un paso de lavado, se elimina el ZnT8-biotina que no se ha unido y, en un tercer paso de incubación, se determina la cantidad de ZnT8-biotina unido 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 405 nm y a 450 nm mediante un lector de placas de ELISA. Una mayor absorbancia indica la presencia de ZnT8 Ab en la muestra problema. La lectura a 405 nm permite la determinación cuantitativa de absorbancias altas y debe utilizarse cuando la DO a 450 nm es superior a 3,0. Si solo es posible leer a una longitud de onda, podría utilizarse la longitud de 405 nm. El intervalo de medición es de 15-2000 u/ml (unidades RSR arbitrarias).

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 µl es suficiente para un ensayo (determinaciones de 25 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 el ensayo se puede utilizar plasma con

citrato y con heparina. En los estudios en los que se añadieron sueros positivos para ZnT8 Ab a muestras de plasma con EDTA, se observó que las señales eran menores en comparación con el suero añadido del mismo donante. En particular, los valores de DO₄₅₀ con el plasma con EDTA enriquecido fueron del 33–65 % del suero añadido o del 37–64 % en términos de u/ml (19 muestras con concentraciones de suero añadido de entre 11 u/ml y 326 u/ml). 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 10–15 000 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
	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).
Tapa para placas de ELISA.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS SUMINISTRADOS

Conservar los kits sin abrir y todos los componentes a una temperatura de 2–8 °C.

A	Pocillos recubiertos con ZnT8 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 3 meses.
B1–5	Calibradores 10, 20, 75, 500, 2000 u/ml (unidades RSR arbitrarias) 5 × 0,7 ml Listos para usar
C1–2	Controles positivos I y II (ver la etiqueta para conocer el intervalo de concentración) 2 × 0,7 ml Listos para usar
D	Control negativo 0,7 ml Listo para usar
E	ZnT8-biotina 3 viales Liofilizado
	Reconstituir cada vial con 5,5 ml de tampón de reconstitución de ZnT8-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 ZnT8-biotina 2 × 15 ml, color rojo Listo para usar
G	Estreptavidina-peroxidasa (SA-POD) 0,7 ml Concentrada
	Diluir 1:20 con diluyente para SA-POD (H) antes de usar. 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 usar
I	Sustrato de peroxidasa (TMB) 15 ml Listo para usar
J	Solución de lavado concentrada 125 ml Concentrada
	Diluir 10x con agua pura antes de usar. Por ejemplo, 100 ml (J) + 900 ml agua pura. Conservar a 2–8 °C hasta la fecha de caducidad del kit.
K	Solución de parada 12 ml Lista para usar

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Dejar reposar todos los reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C) el día que se vayan a utilizar, excepto el ZnT8-biotina y el tampón de reconstitución de ZnT8-biotina. Se recomienda utilizar una pipeta de repetición de tipo Eppendorf en los pasos 4, 7, 10 y 11.

		ELISA, utilizando como blancos los pocillos que contienen únicamente 100 µl de TMB (I) y 100 µl de solución de parada (K).
--	--	--

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

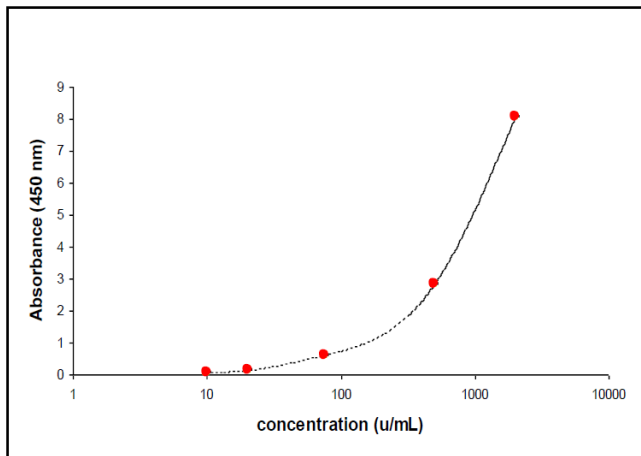
Se puede establecer una curva de calibración representando gráficamente la concentración de calibrador en el eje de las abscisas (escala logarítmica) y la absorbancia de los calibradores en el eje de las ordenadas (escala lineal). A continuación, se pueden leer las concentraciones de ZnT8 Ab en los sueros 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. El control negativo (D) tiene una concentración de 0 u/ml, pero se le puede asignar un valor de 1 u/ml para facilitar el tratamiento informático de los datos. Las muestras con una concentración elevada de ZnT8 Ab pueden diluirse con el control negativo del kit (D). 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)

Calibrador	Abs. 450 nm	Conc. u/ml	Abs. 405 nm	Conc. u/ml
B1	0,068	10	0,023	10
B2	0,138	20	0,043	20
B3	0,610	75	0,184	75
B4	2,838	500	0,853	500
B5	8,089	2000	2,379	2000
Control negativo (D)	0,015	0	0,008	0
Control positivo (CI)	0,402	46	0,121	46
Control positivo (CII)	1,221	200	0,367	196

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).

Día 1	1.	Pipetear 25 µl de calibradores (B1–5), controles (C1–2 y D) y sueros de los pacientes en los pocillos correspondientes, por duplicado, dejando dos pocillos vacíos para los blancos (ver el paso 12).
	2.	Tapar el marco de soporte, agitar durante unos 5 segundos en un agitador de placas e incubar toda la noche, durante 16-20 horas, a una temperatura de 2–8 °C sin agitar.
Día 2	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 ZnT8-biotina (E) frío reconstituido en cada pocillo (excepto los blancos). 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 (G) diluida en cada pocillo (excepto los blancos).
	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 (incluidos los blancos) e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos sin agitar.
Día 2 (continuación)	11.	Pipetear 100 µl de solución de parada (K) en cada pocillo (incluidos los blancos). 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 30 minutos, leer la absorbancia de cada pocillo a 405 nm y luego a 450 nm con un lector de placas de



Absorbancia (450 nm)
Concentración (u/ml)

VALOR DE CORTE DEL ENSAYO

Valor de corte	u/ml
Negativo	<15 u/ml
Positivo	≥15 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 ZnT8 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-ZnT8 de RSR alcanzó una especificidad del 99 % ($n = 90$) y una sensibilidad del 72 % ($n = 50$).

Se analizaron 297 sueros de donantes de sangre sanos, con un valor medio de $1,9 \pm 3,84$ u/ml. En 3 sueros (1 %) se obtuvieron valores de 45 u/ml, 41 u/ml y 19 u/ml, por encima del valor de corte del ensayo.

Límite inferior de detección

El control negativo se analizó 20 veces y se calcularon la media y la desviación estándar. El límite inferior de detección con +2 desviaciones estándar fue de 1,2 u/ml cuando se asignó un valor de 1 u/ml al control negativo.

Precisión interensayo

Muestra	Media u/ml ($n = 20$)	CV (%)
A	102	9,3
B	64	7,5
C	26,6	8,7

Precisión intraensayo

Muestra	Media u/ml ($n = 25$)	CV (%)
1	160	6,2
2	63	6,2
3	24,5	3,5

Exactitud clínica

Los sueros que contenían factor reumatoide ($n = 26$) y los sueros que contenían autoanticuerpos contra la tiroglobulina ($n = 20$), la peroxidasa tiroidea ($n = 24$), la acuaporina-4 ($n = 3$) y el receptor de acetilcolina ($n = 9$) dieron negativo para ZnT8 Ab. El 4 % ($n = 24$) de los sueros positivos para anticuerpos antirreceptor de TSH y el 9 % ($n = 23$) de los sueros positivos para anticuerpos anti-21-hidroxilasa dieron positivo para ZnT8 Ab con el kit para ELISA de autoanticuerpos anti-ZnT8 de RSR.

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 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

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.

Sustrato de peroxidasa (TMB)

Palabra de advertencia: Peligro



Indicaciones de peligro

H360: Puede perjudicar 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

EUH 208: Contiene 2-cloroacetamida. Puede provocar una reacción alérgica.

Este kit es solo para uso profesional. Seguir cuidadosamente las instrucciones. Respetar las fechas de caducidad indicadas en las etiquetas y la estabilidad especificada para los reactivos reconstituidos. Consultar la ficha de datos de seguridad para obtener información más detallada sobre la seguridad. Evitar cualquier acción que pueda derivar en la ingestión. Evitar el contacto con la piel y la ropa. Utilizar ropa de protección. 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

Día 1	Dejar reposar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20–25 °C) el día que se vayan a utilizar, excepto el ZnT8-biotina y el tampón de reconstitución de ZnT8-biotina	
	Pipetear:	25 µl de calibradores, controles y sueros de los pacientes en los pocillos (excepto los blancos) y agitar durante 5 segundos
	Incubar:	Durante la noche (16–20 horas) a 2–8 °C sin agitar
Día 2	Aspirar/decantar:	Placa
	Lavar:	La placa tres veces y secar golpeando suavemente sobre un material absorbente ¹
	Pipetear:	100 µl de ZnT8-biotina frío (reconstituido) en cada pocillo (excepto los blancos)
	Incubar:	1 hora a 2–8 °C sin agitar
	Aspirar/decantar:	Placa
	Lavar:	La placa tres veces y secar golpeando suavemente sobre un material absorbente ¹
	Pipetear:	100 µl de SA-POD (diluida 1:20) en cada pocillo (excepto los blancos)
	Incubar:	20 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C) en un agitador de placas de ELISA a 500 agitaciones/min
	Aspirar/decantar:	Placa
	Lavar:	La placa tres veces, aclarar con agua pura y secar golpeando suavemente sobre un material absorbente ¹
	Pipetear:	100 µl de TMB en cada pocillo (incluidos los blancos)
	Incubar:	20 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C) en la oscuridad
	Pipetear:	100 µl de solución de parada en cada pocillo (incluidos los blancos) y agitar durante 5 segundos
	Leer la absorbancia a 405 nm y luego a 450 nm en los 30 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. Asimismo, el paso de lavado con agua pura puede omitirse si se utiliza un lavador automático.		