



DCM084-7
Ed. 12/2023

IA2

per analisi di routine

Test ELISA quantitativo per l'identificazione di autoanticorpi circolanti contro gli antigeni "protein tyrosine phosphatase" in siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO084

DESTINAZIONE D'USO

IA2 kit è un metodo immunoenzimatico per la determinazione quantitativa degli autoanticorpi contro la "protein tyrosine phosphatase" (Ab IA2) in siero o plasma umano.

Il kit IA2 è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il diabete di tipo 1, anche conosciuto come mellito insulino-dipendente (IDDM), è caratterizzato dalla distruzione autoimmune cronica delle cellule-beta pancreatiche secernenti insulina. Questa patogenesi è dovuta probabilmente all'esposizione di soggetti geneticamente suscettibili ad agenti ambientali. Si pensa che la distruzione autoimmune delle cellule-beta pancreatiche sia completamente asintomatica fino alla perdita dell'80-90% delle cellule. Questo processo può iniziare a qualsiasi età e può durare anni per essere completato. Durante la fase preclinica, questo processo autoimmune è evidenziabile per la presenza di autoanticorpi circolanti contro gli antigeni delle cellule pancreatiche beta. I primi studi basati su tecniche di immunofluorescenza per gli anticorpi contro le cellule delle isole (ICA) erano di difficile Calibratorizzazione per cui sono stati utilizzati una combinazione di dosaggi RIA per la determinazione di anticorpi contro gli antigeni delle cellule beta, come l'insulina (IAA), acido glutammico decarbossilasi (GAD) e tirosina fosfatasi ICA512. Gli IA2, membri della famiglia delle tirosina fosfatasi sono localizzati nei granuli densi delle cellule-beta pancreatiche. IA2 condivide questa identità di sequenza con l'antigene 512 delle cellule insula. La frequenza più elevata degli anticorpi contro IA2 è spiegata con la presenza degli autoanticorpi diretti verso il gruppo terminale COOH di IA2 che è assente nelle molecole ICA512. Gli autoanticorpi IA2 sono presenti nella maggioranza degli individui con un nuovo sviluppo di diabete di tipo 1 e negli individui nella fase pre-diabetica della malattia. La comparsa degli anticorpi Anti IA2 sembra essere correlata con la progressione rapida ed evidente del diabete di tipo 1. La combinazione di test per gli autoanticorpi GAD65 e IA2 è molto rilevante per la valutazione del rischio di diabete di tipo 1 nei bambini e adolescenti. Lo screening per gli

autoanticorpi GAD65 e IA2 rileva più di 90 % dei soggetti a rischio per il diabete di tipo 1 e può essere in grado di sostituire la tecnica ICA.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il principio del test si basa sulla capacità degli autoanticorpi IA2 di agire bivalentemente e di formare un ponte tra l'IA2 immobilizzato e la Biotin-IA2. Nella prima fase gli autoanticorpi del campione si fissano all'IA2 immobilizzati sulle micropiastre. Nella seconda fase Biotin-IA2 fissa questo complesso. La Biotin-IA2 fissata è proporzionale alla quantità di autoanticorpi IA2 nel siero del paziente. La biotin-IA2 non fissata è eliminata per lavaggio. La biotin-IA2 fissata può essere quantificata per aggiunta di Streptavidin-perossidase e di un substrato cromogenico (TMB) e lettura della densità ottica (OD) a 450 nm. La concentrazione di anticorpi anti IA2 è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (4 flaconi, 0,7 mL ciascuno)
CAL1 REF DCE002/8407-0
CAL2 REF DCE002/8408-0
CAL3 REF DCE002/8409-0
CAL4 REF DCE002/8410-0
2. Controls (2 flaconi, 0,7 mL ciascuno, pronti all'uso)
Negative Control REF DCE045/8401-0
Positive Control REF DCE045/8402-0
3. Enhancer (1 flacone, 4 mL) REF DCE052-0
4. Streptavidin peroxydase (1 flacone, 0,7 mL) REF DCE041/8441-0
5. Streptavidin peroxydase diluent (1 flacone, 15 mL) REF DCE048/8448-0
6. Biotin (3 flaconi, liofilizzato) REF DCE019/8419-0
7. Biotin diluent (2 flaconi, 15 mL ciascuno) REF DCE047/8447-0
8. Coated Microplate (1 micropiastro breakable)
IA2 umana ricombinante adsorbita su micropiastro REF DCE002/8403-0

9. Substrate solution (1 flacone, 15 mL)
REF DCE004/8404-0
10. Stop solution (1 flacone, 12 mL)
0.25M sulphuric acid **REF DCE005/8405-0**
11. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 125 mL)
REF DCE006/8406-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata o deionizzata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micro piastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 8 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile 1 mese a 2-8°C.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori ed i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN₃) o di ProClin™ 300 come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- **Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]**

Streptavidin peroxylase

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P272 - Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere l'udito.

P302+P352 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

P501 - Smaltire il contenuto/contenitore in un punto di raccolta rifiuti pericolosi o speciali, in conformità con la normativa locale, regionale, nazionale e/o internazionale.

Substrate solution

Tossicità per la riproduzione, categoria 1B



Pericolo

Indicazioni di pericolo:

H360D - Può nuocere al feto.

Consigli di prudenza:

P202 - Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere l'udito.

P308+P313 - IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.

P501 - Smaltire il contenuto/contenitore in un punto di raccolta rifiuti pericolosi o speciali, in conformità con la normativa locale, regionale, nazionale e/o internazionale.

Enhancer

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P272 - Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere l'udito.

P302+P352 - IN CASO DI CONTATTO CON LA

PELLE: lavare abbondantemente con acqua
P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

P501 - Smaltire il contenuto/contenitore in un punto di raccolta rifiuti pericolosi o speciali, in conformità con la normativa locale, regionale, nazionale e/o internazionale.

Streptavidin peroxylase diluent

Hazard statements:

EUH208 - Può provocare una reazione allergica.

Consigli di prudenza:

N/A

- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- **ATTENZIONE: il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni;** si raccomanda

pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso.

A tale scopo Dia.Metra rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.

- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione della Biotin

Preparare una quantità sufficiente di soluzione biotin IA2 ricostituendo un flacone di biotin liofilizzata con X mL di diluente per la biotin- IA2 direttamente prima l'uso. Il valore di X è riportato sul foglio di controllo. Ricostituire ed utilizzare immediatamente prima dell'uso e comunque entro la giornata.

6.2. Preparazione del Wash Solution

Preparare una quantità sufficiente di wash solution diluendo la 10X Conc. Wash Solution 1:10 con acqua distillata o deionizzata. Per esempio, diluire

50 mL della soluzione concentrata con 450 mL di acqua distillata. La soluzione non deve presentare cristalli prima della diluizione; eventualmente dissolvere i cristalli scaldando al max a 37°C. La soluzione diluita può essere conservata a 2-8°C fino a 30 giorni.

6.3. Preparazione della streptavidin peroxydase

Preparare una quantità sufficiente di soluzione di Streptavidin-peroxydase diluendo il concentrato di Streptavidin-peroxydase 1:20 (es: 0,25 mL streptavidina concentrata con 4,75 mL di diluente per streptavidine-peroxydase). La soluzione preparata è stabile fino a 4 settimane a 2-8°C.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₁-C₄), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibrator	Campione /Controlli	Bianco
Campione /Controlli		50 µL	
Calibrator	50 µL		
Enhancer	25 µL	25 µL	
Coprire la piastra con la pellicola di plastica e agitare a >500 rpm per 5 secondi; incubare per almeno 16 ore (over night) a 2-8°C. Portare la piastra a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.			
Biotin	100 µL	100 µL	

Coprire la piastra con la pellicola di plastica e incubare per 1 ora a 2-8°C senza agitare. Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.
Lavaggi: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.

Streptavidine peroxydase	100 µL	100 µL	
--------------------------	--------	--------	--

Coprire la piastra con la pellicola di plastica e incubare per 20 minuti a temperatura ambiente (22-28°C) agitando > 500 rpm. Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.

Lavaggi: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.

Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
-----------	--------	--------	--------

Coprire la piastra e incubarla 20 minuti al buio a temperatura ambiente (22-28°C).

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Agitare la piastra per 5 secondi a >200 rpm. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.

La procedura di lavaggio è cruciale. Un lavaggio insufficiente provoca una bassa precisione e Densità Ottiche falsamente elevate. Senza agitazione la OD misurata sarà del 20% più bassa con conseguente perdita di sensibilità.

7. RISULTATI

7.1. Curva di calibrazione

La curva di calibrazione è stabilita tracciando i valori medi delle OD dei Calibratori 1 - 4 sull'asse delle ordinate (asse-y), contro le rispettive concentrazioni degli autoanticorpi IA2 sulle ascisse (asse-x). Inoltre si consiglia di utilizzare il controllo negativo (vedere sotto).

La concentrazione degli anticorpi IA2 dei controlli e dei campioni incogniti è direttamente in IU/mL riportando il valore della OD a 450 nm sulla curva di calibrazione.

L'IA2 kit può essere anche utilizzato con Computer Assisted Analysis utilizzando software in grado di tracciare curve con spline smoothing fit.

Esempio:

Campione	DO (a) 450 nm	DO (b) 450 nm	DO (media)	IU/mL
Controllo Neg	0.076	0.078	0.077	0
Calibrator 1	0.226	0.230	0.228	7.5
Calibrator 2	0.633	0.662	0.648	35
Calibrator 3	2.672	2.835	2.754	120
Calibrator 4	3.462	3.744	3.693	350
Controllo Pos	---	---	---	---
Paziente 1	0.517	0.547	0.532	43.6

7.2. Valori di riferimento

IA2	
negativo	< 7.5 IU/mL
positivo	≥ 7.5 IU/mL

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

8. CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA

8.1. Calibrazione

Il kit IA2 è calibrato contro le soluzioni di riferimento WHO NIBSC 97/550 e le concentrazioni di anticorpi IA2 sono espresse in IU/mL.

8.2. Linearità

A causa della natura eterogenea della popolazione degli anticorpi e della loro specificità e affinità i valori teorici attesi per le diluizioni degli anticorpi IA2, in alcuni casi potrebbero non corrispondere alla concentrazione misurata nel corso di un test di recupero.

8.3. Specificità e Sensibilità

Usando un cut-off di 7,5 IU/mL, il kit IA2 ha una sensibilità di 65,3% e una specificità di 100%, per i pazienti con diabete di tipo 1 di recente sviluppo.

8.4. Limite di rilevazione

La sensibilità analitica del kit IA2 è 0.37 IU/mL.

8.5. Variazione Intra e inter-assay

8.5.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando 12 volte tre diversi sieri con valori situati dentro il range di lavoro della curva di calibrazione. La variabilità intra-assay è ≤ 4,6%

8.5.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la misura di un siero di controllo con kit appartenenti a lotti diversi e/o con diverse combinazioni di lotti di reagenti. La variabilità inter-assay è ≤ 4,5%.

9. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Lan MS, Wasserfall C, Maclaren NK & Notkins AL: IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes

mellitus; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93: 6367-6370

2. Pietropaolo M, Hutton JC & Eisenbarth GS: Protein tyrosine phosphatase-like proteins: Link with IDDM; Diabetes Care 1997, 20: 208-214
3. Batstra M, HJ Anstoot & P Herbrink: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using β -cell autoantibodies; Clin Lab 2001, 47: 497-507
4. Seissler J, E.Hatziagelaki & WA Scherbaum: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes; Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001, 109 Suppl 2: S304-S316
5. Pozzilli P, S Manfrini & L Monetini: Biochemical markers of type 1 diabetes; clinical use, Scand J Clin Lab Invest 2001, 61: 38-44
6. Winter WE, N Harris & D Schatz: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes; Clinical Diabetes 2002, 20: 183-191

Ed. 12/2023

DCM084-7



DCM084-7
Ed. 12/2023

IA2

for routine analysis

Quantitative determination of autoantibodies to "Protein Tyrosine Phosphatase IA2" in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C – 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO084

INTENDED USE

IA2 ELISA kit is an enzyme immunoassay for the quantitative determination of autoantibodies to Protein Tyrosine Phosphatase (IA2 Abs) in human serum or plasma.

IA2 kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Type 1 diabetes, also known as insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), results from a chronic autoimmune destruction of the insulin-secreting pancreatic beta cells, probably initiated by exposure of genetically susceptible host to an environmental agent. Autoimmune destruction of beta cells is thought to be completely asymptomatic until 80 - 90% of the cells are lost. This process may take years to complete and may occur at any time. During the preclinical phase, this autoimmune process is marked by circulating autoantibodies to beta cell antigens. These autoantibodies are present years before the onset of type 1 diabetes and prior to clinical symptoms. Early studies utilized the immunofluorescence test for islet-cell antibodies (ICA), which has been difficult to Calibratorize and is now replaced by a combination of several radioimmunoassays for antibodies against specific beta cell antigens, such as insulin (IAA), glutamic acid decarboxylase (GAD) and tyrosine phosphatase ICA 512 (IA2). IA2, a member of the protein tyrosine phosphatases family is localized in the dense granules of pancreatic beta cells and the second defined recombinant islet cell antigen. IA2 shares sequence identity with the islet cell antigen 512. The higher frequency of antibodies to IA2 is explained by the presence of autoantibodies directed to the COOH terminus of IA2 which is lacking in the ICA512 molecule. IA2 autoantibodies are present in the majority of individuals with new-onset type 1 diabetes and in individuals in the pre-diabetic phase of the disease. The appearance of autoantibodies to IA2 seems to be correlated with the rapid progression to overt type 1 diabetes.

The combination of tests for GAD65 and IA2 autoantibodies is highly relevant for risk assessment of type 1 diabetes in children and adolescence. The screening for GAD65 and IA2 autoantibodies detect more than 90 % of subjects at risk for type 1 diabetes and may, therefore, possess the potential to replace ICA technique.

2. PRINCIPLE

The assay system uses the ability of IA2 antibodies to act divalently and form a bridge between immobilized IA2 and liquid-phase IA2-Biotin. In the first step IA2 antibodies from the sample bind to IA2 coated on the microtiter plate. In a second step IA2-Biotin binds to this complex. The bound IA2-Biotin correlates with the amount of IA2 antibodies in patient's serum. Unbound IA2-Biotin is removed by the washing step.

The bound IA2-Biotin is quantified by addition of Streptavidin-peroxidase and a chromogenic substrate (TMB) and reading the optical density (OD) at 450 nm. The concentration of anti IA2 antibodies is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (4 vials, 0.7 mL each)

CAL1	REF DCE002/8407-0
CAL2	REF DCE002/8408-0
CAL3	REF DCE002/8409-0
CAL4	REF DCE002/8410-0
2. Controls (2 vials, 0.7 mL each, ready to use)

Negative Control	REF DCE045/8401-0
Positive Control	REF DCE045/8402-0
3. Enhancer (1 vial, 4 mL) REF DCE052-0
4. Streptavidin-peroxydase (1 vial, 0.7 mL) REF DCE041/8441-0
5. Streptavidin-peroxydase diluent (1 vial, 15 mL) REF DCE048/8448-0
6. Biotin (3 vial, lyophilised) REF DCE019/8419-0
7. Biotin diluent (2 vials, 15 mL each) REF DCE047/8447-0
8. Coated Microplate (1 breakable microplate)
Human recombinant IA2 adsorbed on the microplate REF DCE002/8403-0
9. Substrate solution (1 vial, 15 mL) REF DCE004/8404-0
10. Stop solution (1 vial, 12 mL)
0.25M sulphuric acid REF DCE005/8405-0
11. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 125 mL) REF DCE006/8406-0

3.2. Necessary reagents not supplied

Distilled or deionized water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm).

Notes

Store all reagents between 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 8 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable 1 month at 2-8°C.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, Calibrators and Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN₃) or ProClin™ 300 as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Streptavidin-peroxydase

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing 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.

P501 - Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection point, in accordance with local, regional, national and/or international regulation.

Substrate solution

Reproductive toxicity, Category 1B



Danger

Hazard statements:

H360D - May damage the unborn child.

Precautionary statements:

P202 - Do not handle until all safety precautions have been read and understood.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

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

P501 - Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection point, in accordance with local, regional, national and/or international regulation.

Enhancer

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing mist, vapours.

P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing 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.

P501 - Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection point, in accordance with local, regional, national and/or international regulation.

Streptavidin-peroxydase diluent

Hazard statements:

EUH208 - May produce an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

N/A

- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.** For this purpose, Dia.Metra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If

more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate

- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Biotin

Prepare the IA2-Biotin solution by reconstitution of one vial of lyophilized IA2-Biotin with X mL diluent for IA2-Biotin directly prior to use. The amount X for reconstitution is shown on the certificate of quality enclosed.

Reconstitute and use immediately before using and within the day.

6.2. Preparation of the Wash Solution

Prepare a sufficient amount of washing solution by diluting the 10X Conc. Wash Solution 1:10 with distilled or deionized water. For example, dilute 50 mL of the Concentrate Wash with 450 mL of distilled water. The solution should be free of crystals before dilution, otherwise dissolve by warming up to max 37°C. The diluted washing solution can be stored at 2-8°C up to 30 days.

6.3. Preparation of the Streptavidin-peroxydase

Prepare a sufficient amount of Streptavidin-peroxydase solution by diluting the concentrated streptavidin-peroxydase 1:20 with diluent (0.25 mL streptavidin concentrate with 4.75 mL diluent for streptavidin-peroxydase). The solution prepared is stable up to 4 weeks at 2-8°C.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the

calibration curve (C₁-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Sample or Controls		50 µL	
Calibrator C ₁ -C ₄	50 µL		
Enhancer	25 µL	25 µL	
Cover the plate, shake > 500 rpm for 5s. Incubate at 2-8°C overnight (at least 16h). Allow covered plate to reach room temperature (22- 28°C). Remove the content from each well and wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.			
Biotin	100 µL	100 µL	
Cover the plate and incubate at 2-8°C for 1 hour without shaking. Remove the content from each well and wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Washing: follow the same indications of the previous point.			
Streptavidin peroxidase	100 µL	100 µL	
Cover the plate (to prevent contamination).Incubate at room temperature (22-28°C) for 20 minutes while shaking > 500 rpm. Remove the content from each well and wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Washing: follow the same indications of the previous point.			
Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22-28°C) for 20 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the plate for 5 second > 200 rpm. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

Please note that the washing procedure is crucial. Insufficient washing will result to poor precision and falsely elevated OD readings. Without shaking the OD will be 20% lower with a consequent loss of sensitivity.

7. RESULTS

7.1. Calibration curve

The calibration curve is established by plotting the mean OD-values of the Calibrators 1-4 on the

ordinate, y-axis, versus their respective IA2 Ab-concentrations on the abscissa, x-axis. In addition the negative control (CI) should be used (see below).

The IA2 Abs concentrations of the controls and the unknown samples are directly read off in IU/mL from the measured OD450 values.

The IA2 kit may be used also with Computer Assisted Analysis using software able to curves with spline smoothing fit.

Example:

Sample	OD (a) 450 nm	OD (b) 450 nm	OD (mean)	IU/mL
Neg Control	0.076	0.078	0.077	0
Calibrator 1	0.226	0.230	0.228	7.5
Calibrator 2	0.633	0.662	0.648	35
Calibrator 3	2.672	2.835	2.754	120
Calibrator 4	3.642	3.744	3.693	350
Pos Control	---	---	---	---
Patient 1	0.517	0.547	0.532	43.6

7.2. Reference values

IA2	
Negative	< 7.5 IU/mL
Positive	≥ 7.5 IU/mL

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

8. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

8.1. Calibration

IA2 kit is calibrated against the WHO reference preparation NIBSC 97/550 and concentrations of IA2 Abs are therefore expressed in IU/mL.

8.2. Linearity

On the basic of the heterogeneous nature of the autoantibody population and in view of epitope specificity and affinity of the autoantibodies exceptions are possible in some cases.

8.3. Specificity and Sensitivity

Using a cut-off of 7.5 IU/mL, IA2 kit shows a sensitivity of 65.3% and specificity of 100%, regarding patients with newly onset type 1 diabetes.

8.4. Detection Limits

The analytical sensitivity of IA2 kit was established to be 0.37 IU/mL.

8.5. Intra and inter-assay variations

8.5.1. Intra-Assay

Within run variation was determined by replicate 12 times three different sera with values in the range of

calibration curve. The within assay variability is $\leq 4.6\%$

8.5.2. *Inter-Assay*

Between run variation was determined by replicate the measurements of one control serum with different lots of kits and/or different mix of lots of reagents. The between assay variability is $\leq 4.5\%$.

9. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Lan MS, Wasserfall C, Maclaren NK & Notkins AL: IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93: 6367-6370
2. Pietropaolo M, Hutton JC & Eisenbarth GS: Protein tyrosine phosphatase-like proteins: Link with IDDM; Diabetes Care 1997, 20: 208-214
3. Batstra M, HJ Anstoot & P Herbrink: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using β -cell autoantibodies; Clin Lab 2001, 47: 497-507
4. Seissler J, E.Hatziagelaki & WA Scherbaum: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes; Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001, 109 Suppl 2: S304-S316
5. Pozzilli P, S Manfrini & L Monetini: Biochemical markers of type 1 diabetes; clinical use, Scand J Clin Lab Invest 2001, 61: 38-44
6. Winter WE, N Harris & D Schatz: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes; Clinical Diabetes 2002, 20: 183-191



DCM084-7
Ed. 12/2023

IA2

para análisis de rutina

Ensayo ELISA cuantitativo para la identificación de autoanticuerpos circulantes contra los antígenos de la proteína tirosina fosfatasa en suero y plasma humano

IVD



LOT

Vease la etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO084

USO PREVISTO

El análisis IA2 es un ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa de autoanticuerpos contra la proteína tirosina fosfatasa (anticuerpos AI-2) en suero y plasma humano.

El kit IA2 está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLINICA

La diabetes de tipo 1, o diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), está causada por la destrucción autoinmune crónica de las células pancreáticas beta productoras de insulina. Es probable que la enfermedad se desencadene como consecuencia de la exposición de individuos genéticamente predispuestos a factores ambientales. Se estima que la destrucción autoinmune de las células beta es totalmente asintomática hasta que se pierde entre el 80 y el 90 % de dichas células. Este proceso puede comenzar a cualquier edad y en cualquier momento, y tardar años en completarse.

Durante la fase preclínica, este proceso autoinmune es denunciado por la presencia de autoanticuerpos circulantes contra los antígenos de las células pancreáticas beta.

Los primeros estudios basados en técnicas de inmunofluorescencia para detectar anticuerpos contra las células de los islotes pancreáticos (ICA) eran difíciles de estandarizar, razón por la cual actualmente se utiliza una combinación de varios ensayos radioinmunes para la determinación de anticuerpos contra los antígenos específicos de las células beta, tales como la insulina (AAI), la glutamato-decarboxilasa (AI-2) y la tirosina fosfatasa ICA 512 (AI-2).

Los AI-2, pertenecientes a la familia de las tirosina fosfatasas, están localizados en los gránulos densos de las células pancreáticas beta. Los AI-2 comparten esta identidad de secuencia con el antígeno 512 de las células de los islotes.

Un número elevado de anticuerpos anti-AI-2 se explica por la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra el grupo terminal COOH de AI-2, que está ausente en las moléculas ICA 512.

Los autoanticuerpos anti-AI-2 están presentes en la mayoría de los individuos con manifestación reciente de diabetes de tipo 1 y en aquellos que se encuentran

en la fase prediabética de la enfermedad. La aparición de anticuerpos anti-AI-2 parece estar relacionada con la evolución rápida hacia la manifestación de la diabetes de tipo 1.

La combinación de análisis para detección de autoanticuerpos AI-265 y AI-2 es de suma importancia a la hora de evaluar el riesgo de diabetes de tipo 1 en niños y adolescentes. El screening de autoanticuerpos AI-265 y AI-2 detecta más del 90 % de los individuos con riesgo a padecer diabetes de tipo 1, y puede reemplazar la técnica ICA.

2. PRINCIPIO

El análisis se basa en la capacidad de los autoanticuerpos AI-2 de actuar de manera bivalente y formar un puente entre el AI-2 fijado y el AI-2 biotinilado. En la primera fase, los autoanticuerpos de la muestra se ligan con el AI-2 fijado en las microplacas. En la segunda fase, el AI-2 biotinilado se liga a este complejo. El AI-2 biotinilado es proporcional a la cantidad de autoanticuerpos AI-2 presentes en el suero del paciente. El AI-2 no biotinilado se elimina mediante lavado. El AI-2 biotinilado se cuantifica añadiendo estreptavidina-peroxidasa y un sustrato cromogénico (TMB); se lee la densidad óptica (DO) a 450 nm.

3. REACTIVOS, MATERIALES Y INSTRUMENTOS

3.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

- Calibradores (4 frascos, 0,7 mL cada uno)
CAL1 REF DCE002/8407-0
CAL2 REF DCE002/8408-0
CAL3 REF DCE002/8409-0
CAL4 REF DCE002/8410-0
- Controles (2 frascos, 0,7 mL cada uno)
Control Negativo REF DCE045/8401-0
Control Positivo REF DCE045/8402-0
- Potenciador (1 frasco, 4 mL) REF DCE052-0
- Estreptavidina-peroxidasa conc. 20X (1 frasco, 0,7 mL) REF DCE041/8441-0
- Estreptavidina-peroxidasa diluent (1 frasco, 15 mL) REF DCE048/8448-0

6. Biotina (3 frascos, liofilizados)
REF DCE019/8419-0
7. Diluyente Biotina (2 frascos, 15 mL cada uno)
REF DCE047/8447-0
8. Microplaca ricubierta (1 microplaca divisible)
IA-2 adsorbiso en la microplaca
REF DCE002/8403-0
9. Solución substrato (1 frasco, 15 mL)
REF DCE004/8404-0
10. Solución de parada (1 frasco, 12 mL)
Ácido sulfúrico 0,25M
REF DCE005/8405-0
11. Solución de lavado conc 10X (1 frasco, 125 mL)
REF DCE006/8406-0

3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada o desionizada.

3.3. Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Nota

Conservar todos los reactivos a 2÷8°C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 8 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta 1 mes a 2-8°C.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradores y de los controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y 2, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y lo control positivo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN₃) o ProClin™ 300 como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Estreptavidina-peroxidasa conc. 20X

Sensibilización cutánea, categoría 1



Atención

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/ los vapores/el aerosol.

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

P280 - Llevar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara/los oídos.

P302+P352 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.

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/contenedor en un punto de recogida de residuos peligrosos o especiales, de acuerdo con la normativa local, regional, nacional y/o internacional.

Solución substrato

Toxicidad para la reproducción, categoría 1B



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/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara/los oídos.

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

P501 - Eliminar el contenido/contenedor en un punto de recogida de residuos peligrosos o especiales, de acuerdo con la normativa local, regional, nacional y/o internacional.

Potenciador

Sensibilización cutánea, categoría 1



Atención

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/ los vapores/el aerosol.

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

P280 - Llevar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara/los oídos.

P302+P352 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.

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/contenedor en un punto de recogida de residuos peligrosos o especiales, de acuerdo con la normativa local, regional, nacional y/o internacional.

Estreptavidina-peroxidasa diluent

Indicaciones de peligro:

EUH208 - Puede provocar una reacción alérgica.

Consejos de prudencia:

N/A

- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren

a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.

- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- **ATENCIÓN: se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa adecuadamente, podría contaminarse por agentes externos;** se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad necesaria exacta de conjugando y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática,** se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la fluidica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteinización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; **este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso.** Para tal fin, Dia.Metra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de la biotina

Preparar una cantidad suficiente de solución reconstituyendo un vial de Al-2-biotina liofilizada con X mL del diluyente específico directamente antes del uso. El valor de X está disponible en el certificado de calidad ("Quality Control Report").

Reconstituir inmediatamente antes de su uso.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Preparar una cantidad suficiente de solución de lavado diluyendo el tampón concentrado en proporción de 1+9 con agua destilada o desionizada.

Por ejemplo, diluir 50 ml de solución concentrada en 450 mL de agua destilada. Antes de la dilución, la solución no debe presentar cristales; si fuera necesario, disolverlos calentando el producto hasta un máximo de 37°C. La solución diluida se conserva hasta 30 días a 2-8°C.

6.3. Preparación de la estreptavidina-peroxidasa

Preparar una cantidad suficiente de solución de estreptavidina-peroxidasa diluyendo el correspondiente concentrado en proporción de 1+19 (0,25 mL de concentrado de estreptavidina con 4,75 mL del respectivo diluyente). La solución preparada permanece estable hasta 16 semanas conservada a 2-8°C.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₁-C₄), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivos	Calibradores	Muestras/ Controles	Blanco
Muestras/ Controles		50 µL	
Calibradores C ₁ -C ₄	50 µL		
Potenciador	25 µL	25 µL	
Cubrir la placa con la lámina de plástico y agitar a >500 rpm durante 5 segundos; incubar como mínimo 16 horas (toda una noche) a 2-8°C. Dejar que la placa alcance la temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces			

con 0,3 mL de solución de lavado diluida.

Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.

Biotina	100 µL	100 µL	
Sellar la placa con la película plástica e incubar 1 hora a 2-8°C sin agitar. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Lavados: siga las mismas instrucciones del punto anterior.			
Estreptavidina peroxidasa	100 µL	100 µL	
Sellar la placa con la película plástica e incubar 20 minutos a temperatura ambiente (22-28°C) agitando > 500 rpm. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Lavados: siga las mismas instrucciones del punto anterior.			
Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Cubrir la placa e incubar 20 minutos a temperatura ambiente (22-28°C), protegida de la luz			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la placa 5 segundos a >200 rpm. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente a una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

El procedimiento de lavado es crucial. Un lavado insuficiente da como resultado una escasa precisión y DO falsamente altas. Sin agitación, las mediciones de DO serán aproximadamente un 20% más bajas, con pérdida de sensibilidad.

7. RESULTADOS

7.1. Curva de calibración

La Curva de calibración se determina indicando la media de los valores de DO de los Calibradores 1-4 en el eje y de ordenadas, contra sus respectivas concentraciones de

autoanticuerpos Al-2 en el eje x de abscisas. Además se debe utilizar el control negativo (CI) (ver abajo).

La concentración de autoanticuerpos Al-2 de los controles y las muestras desconocidas se calcula directamente en IU/mL a partir de los valores de DO medidos a 450 nm indicados en la Curva de calibración.

El kit IA2 puede utilizarse también para análisis computarizados, con un software que utilice un mecanismo de alisado por splines.

Ejemplo:

Muestra	DO (a) 450 nm	DO (b) 450 nm	DO (media)	IU/mL
Control Neg	0.076	0.078	0.077	0
Estandar 1	0.226	0.230	0.228	7.5
Estandar 2	0.633	0.662	0.648	35
Estandar 3	2.672	2.835	2.754	120
Estandar 4	3.462	3.744	3.693	350
Control Pos	---	---	---	---
Paciente 1	0.517	0.547	0.532	43.6

7.2. Valores de referencia

IA2	
negativo	< 7.5 IU/mL
positivo	≥ 7.5 IU/mL

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

8. CARACTERÍSTICAS

8.1. Calibración

El kit IA2 se calibró contra el preparado de referencia WHO NIBSC 97/550; por esta razón, las concentraciones de anticuerpos AI-2 se expresan en IU/mL.

8.2. Linealidad

A causa de la naturaleza heterogénea de la población de autoanticuerpos y vista su especificidad epitópica y su afinidad, los valores teóricos esperados para las diluciones de anticuerpos AI-2 podrían no corresponder, en algunos casos, a la concentración registrada durante un análisis de recuperación.

8.3. Especificidad y sensibilidad

Aplicando un valor límite de 7.5 IU/mL, el kit anti-AI-2 tiene una sensibilidad del 65.3% y una especificidad del 100% en pacientes con manifestación reciente de diabetes de tipo 1.

8.4. Límites de detección

La sensibilidad analítica se establece en 0,37 IU/mL.

8.5. Variación intra y entre ensayos

8.5.1. Intra-Assay

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (12x) tres niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es ≤ 4.6%.

8.5.2. Inter-Assay

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo tres niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es ≤ 4.5%.

9. ELIMINACIÓN DE RESIDUO

Los reactivos deben desecharse de acuerdo con las normativas locales.

BIBLIOGRAFÍA

- Lan MS, Wasserfall C, Maclaren NK & Notkins AL: IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93: 6367-6370
- Pietropaolo M, Hutton JC & Eisenbarth GS: Protein tyrosine phosphatase-like proteins: Link with IDDM; Diabetes Care 1997, 20: 208-214
- Batstra M, HJ Anstoot & P Herbrink: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using β -cell autoantibodies; Clin Lab 2001, 47: 497-507
- Seissler J, E.Hatzigelaki & WA Scherbaum: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes; Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001, 109 Suppl 2: S304-S316
- Pozzilli P, S Manfrini & L Monetini: Biochemical markers of type 1 diabetes; clinical use, Scand J Clin Lab Invest 2001, 61: 38-44
- Winter WE, N Harris & D Schatz: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes; Clinical Diabetes 2002, 20: 183-191

Ed. 12/2023

DCM084-7

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs