



# **Anti-IA<sub>2</sub> RIA**

***KIPM2050***



# History

---

## Summary of change :

<b>Previous Version :</b> 180223/1	<b>Current Version :</b> 200224/1
Multilanguage IFU	Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <a href="https://www.diasource-diagnostics.com/">https://www.diasource-diagnostics.com/</a> "
No Manufacturer symbol	Manufacturer symbol added
No IVD symbol	IVD symbol added
PI number	PI number cleared

Read entire protocol before use.

## Anti-IA<sub>2</sub> RIA

### I. INTENDED USE

Radioligand assay for the determination of autoantibodies to Protein Tyrosine Phosphatase IA<sub>2</sub> in human serum.

### II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource Anti-IA<sub>2</sub> RIA Kit
- B. **Catalog number :** KIPM2050: 50 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**For technical assistance or ordering information contact :**  
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

### III. CLINICAL BACKGROUND

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 standardize 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 (IA<sub>2</sub>).

IA<sub>2</sub>, 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. IA<sub>2</sub> shares sequence identity with the islet cell antigen 512. The higher frequency of antibodies to IA<sub>2</sub> is explained by the presence of autoantibodies directed to the COOH terminus of IA<sub>2</sub> which is lacking in the ICA512 molecule.

IA<sub>2</sub> 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 IA<sub>2</sub> seems to be correlated with the rapid progression to overt type 1 diabetes.

The combination of tests for GAD65 and IA<sub>2</sub> autoantibodies is highly relevant for risk assessment of type 1 diabetes in children and adolescence. The screening for GAD65 and IA<sub>2</sub> autoantibodies detect more than 90 % of subjects at risk for type 1 diabetes and may, therefore, possess the potential to replace ICA technique.

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIASource anti-IA<sub>2</sub> kit is a direct assay based on the principle of radioligand assays. Highly purified human recombinant IA<sub>2</sub> (intracellular fragment of IA<sub>2</sub>) is labeled with 125-Iodine. This tracer is used in excess and bound by the IA<sub>2</sub> autoantibodies of the sample.

The DIASource anti-IA<sub>2</sub> tracer meets the highest requirements with regard to purity, enzymologic identity, fast reaction kinetics, cross reactivity at zero level and stability. These are the main prerequisites for the specific binding of the tracer and its exclusive recognition by the IA<sub>2</sub> autoantibodies of the sample.

By adding dissolved Protein A which binds to the Fc moiety of the autoantibodies, sandwich-type complexes are formed. By adding a precipitation buffer the immune complex will be precipitated as a solid phase which facilitates the simple separation of the bound fraction (B) by centrifugation. After removing the supernatant which contains the non-bound tracer by aspiration or decantation, the radioactivity of the remaining precipitate is measured.

The concentration of IA<sub>2</sub> autoantibodies (anti-IA<sub>2</sub>) in the sample is reflected by the specifically bound tracer amount. The radioactive signal (cpm) of the bound fraction (B) is proportional to the autoantibody concentration.

No immune complex is formed if autoantibodies against IA<sub>2</sub> are absent in the sample, as the tracer binds solely to IA<sub>2</sub> autoantibodies, but not to Protein A.

A standard curve with a range of 0.01 - 60 U/ml is established by measuring cpm respectively the binding B/T % of the calibrators 1 - 5. The anti-IA<sub>2</sub> concentration value of the patient's sample is directly read off against this curve.

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	50 Tests Kit	Reconstitution		
<table border="1"> <tr> <td>Ag</td> <td>125I</td> </tr> </table> <p>TRACER: <sup>125</sup>Iodine labelled IA<sub>2</sub> (human, recombinant)</p>	Ag	125I	1 vial Lyo <0.1 MBq	<b>Reconstitute</b> with 2.6ml Reconstitution buffer
Ag	125I			
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Calibrators - N = 1 to 5 Anti- IA<sub>2</sub> calibrators in human serum (conc: see vial label)</p>	CAL	N	5 vials 0.25ml	<b>Ready</b> for use
CAL	N			
<table border="1"> <tr> <td>PROTEIN A</td> </tr> </table> <p>Protein A component</p>	PROTEIN A	1 vial Lyo	<b>Reconstitute</b> with 2.6ml Reconstitution buffer	
PROTEIN A				
<table border="1"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> <p>Reconstitution buffer</p>	REC	SOLN	1 vial 6 ml	<b>Ready</b> for use
REC	SOLN			
<table border="1"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Controls - N = 1 or 2 Anti- IA<sub>2</sub> controls in human serum (conc: see vial label)</p>	CONTROL	N	2 vials 0.25ml	<b>Ready</b> for use
CONTROL	N			
<table border="1"> <tr> <td>PREC</td> <td>AGENT</td> </tr> </table> <p>Precipitation buffer</p>	PREC	AGENT	1 vial 55ml	<b>Ready</b> for use
PREC	AGENT			

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

- Precision pipettes 20 µl, 100 µl, 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Distilled or de-ionized water
- Absorbent paper or paper towel
- Vortexer
- Centrifuge
- γ-counter

#### VII. REAGENT PREPARATION

Allow all of the components to reach room temperature prior to use in the assay, except Precipitation buffer.

##### Tracer:

Reconstitute with 2.6 ml Reconstitution Buffer per vial. Reconstituted tracer remains stable for 2 weeks, stored at 2 - 8 °C.

##### Reconstitution Buffer:

Reconstitution Buffer is ready for use and serves for the reconstitution of the tracer and the Protein A component.

##### Precipitation Buffer:

Precipitation buffer is ready for use and serves for the precipitation and washing of the radioactive immune complex. **Use cold.**

##### Protein A component:

Reconstitute with 2.6 ml Reconstitution Buffer per vial. The reconstituted solution remains stable for 2 weeks stored at 2 - 8 °C.

##### Calibrators:

Ready for use.

##### Controls:

Ready for use.

#### VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

The DIASource anti-IA<sub>2</sub> kit has been designed for 50 determinations. This is sufficient for the analysis of 18 unknown samples as well as for calibrators and control sera, assayed in duplicates.

The expiry date of each component is reported on its respective label and that of the complete kit on the box label.

Upon receipt, all components of the DIASource anti-IA<sub>2</sub> kit have to be kept at 2 - 8 °C, preferably in the original kit box.

#### VIX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Blood is taken by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation. Plasma is also suitable for use in the DIASource anti-IA<sub>2</sub> kit. Lipaemic and hemolytic samples should not be employed.

- The samples may be kept at 2 - 8 °C up to three days. Long-term storage requires - 20 °C.

- Repeated freezing and thawing should be avoided. For multiple use, initially aliquot samples and keep at - 20 °C.

#### X. PROCEDURE

**Use conical tubes for the DIASource anti-IA<sub>2</sub> kit only.**

1. Label test tubes appropriately.
2. Pipette into the corresponding tubes according to assay scheme
  - a. 20 µl calibrators,
  - b. 20 µl control sera,
  - c. 20 µl patient's samples, each.
3. Add 50 µl tracer (prepared from Tracer and Reconstitution buffer), each, to all tubes, including those for total radioactivity .  
*Tubes are now separated until radioactivity is measured.*
4. Incubate overnight (at least 18 hours at 4 - 8 °C).
5. Add 50 µl Protein A solution (prepared from Protein A component and Reconstitution buffer), each.  
(Agitate the mixture gently prior to use - please section VII. Reagent Preparation before use).
6. Incubate 60 minutes (at 4 - 8 °C).
7. Add 1 ml cold precipitation buffer, each.
8. Centrifuge the tubes for 30 minutes at 4-8°C at 2000 x g.
9. Aspirate supernatant completely or decant. For removal of any remaining liquid, turn tubes upside down (minimum 5 minutes) and absorb any droplets by carefully tapping on blotting paper.
10. Measure radioactivity of all tubes including.  
Recommended counting time: 1 minute

## XI. CALCULATION OF RESULTS

The standard curve is established by plotting the mean cpm-values of the calibrators 1 - 5 on the ordinate, y-axis, versus their respective anti-IA<sub>2</sub>-concentrations on the abscissa, x-axis. The respective binding rates B, related to the total radioactivity T may be used as well for setting up the standard curve (B/T %).

**The use of log/log processing is recommended for best results !**

The anti-IA<sub>2</sub> concentrations of the controls and the unknown samples are directly read off in U/ml against the respective cpm or B/T values.

The DIASource anti-IA<sub>2</sub> kit may be used also with Computer Assisted Analysis using software able to plot log/log curves with spline smoothing, such as for sandwich-type assays (IRMA).

## XII. TYPICAL DATA

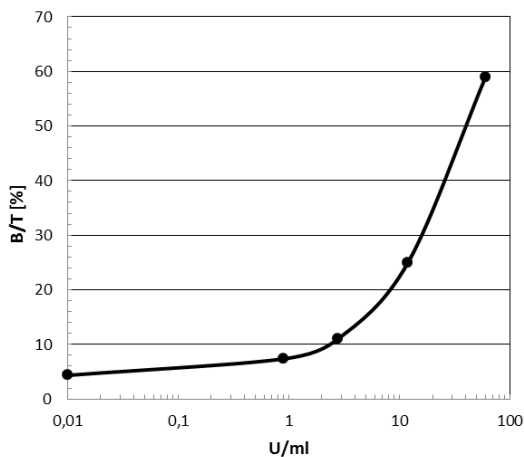
The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

Test tubes	cpm (a)	cpm (b)	cpm (mean)	B/T %	U/ml
Total activity T	60029	58617	59323	100 %	---
Calibrator 1	2526	2606	2566	4.3	0.01
Calibrator 2	4338	4379	4359	7.3	0.5
Calibrator 3	6621	6459	6540	11.0	2.5
Calibrator 4	14858	14822	14840	25.0	12
Calibrator 5	34776	35136	34956	58.9	60
Patient 1	8253	8245	8249	13.9	4.0

Calculation of patient sample 1:

$$\frac{B}{T} (\%) = \frac{8249}{59323} \times 100 = 13,9 \%$$

Typical standard curve:



## XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

### A. Detection limit

The most appropriate and statistically reasonable definition of the lower detection limit of any assay is at present the so-called functional assay sensitivity.

This functional assay sensitivity generally represents that concentration which corresponds to the 10 % (within-assay) and to the 20 % (between assay) coefficient of variation in the respective precision profiles of the assay in the lower concentration range. Upon correct and thorough performance of DIASource anti-IA<sub>2</sub> kit, this value is found at approx. 0.8 U/ml.

Anti-IA<sub>2</sub> values below this defined level of functional assay sensitivity do not meet the statistical criteria for reliability according to GLP (Good Laboratory Practice) and therefore cannot be distinguished from zero due to the statistically necessary certainty.

Anti-IA<sub>2</sub> concentrations above approx. 0.8 U/ml, however, fulfill these criteria and are consequently assessed as valid.

Sample	Intra-assay		Inter-assay	
	Mean (U/ml)	CV (%)	Mean (U/ml)	CV (%)
1	0.76	10.4	0.92	17.0
2	5.80	4.2	6.13	2.9
3	24.68	2.6	24.76	1.9

### B. Specificity

The high quality of the tracer (<sup>125</sup>I-IA<sub>2</sub>) ensures the exclusive reaction of anti-IA<sub>2</sub> autoantibodies in direct assay principle. Any detectable cross reaction with autoantibodies to GAD65, Insulin, thyroglobulin, thyroidal peroxidase, to the TSH receptor and Acetylcholine receptor does not exist.

### C. Calibration

The units in the DIASource anti-IA<sub>2</sub> kit are arbitrary units. DIASource anti-IA<sub>2</sub> assay based on <sup>125</sup>I-IA<sub>2</sub> shows good agreement with an established reference assay. Sensitivity and specificity shows 100 % consensus.

### D. Parallelism of standards and serum samples

Dilutions of specimen in anti-IA<sub>2</sub> free human serum are determined according to their expected theoretical values with DIASource anti-IA<sub>2</sub> M. Based on the heterogeneous nature of the autoantibody population in human serum and in view of epitope specificity and affinity of the autoantibodies, in some cases the sample dilution is not leading to the theoretically expected value.

### E. Limitations

Healthy individuals should be tested negative by using the DIASource anti-IA<sub>2</sub> kit. However, IA<sub>2</sub> autoantibodies may be also present in a rare neurological disorder, Stiff-man Syndrome (SMS). In sera from patients with SMS IA<sub>2</sub> autoantibodies appear seldom. Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic method alone. Physicians are supposed to consider all clinical and laboratory findings possible to state a diagnosis.

## XIV. REFERENCE INTERVALS

Anti-IA <sub>2</sub>	
IA <sub>2</sub> antibodies negative	< 1.0 U/ml
IA <sub>2</sub> antibodies borderline	1.0 – 2.0 U/ml
IA <sub>2</sub> antibodies positive	≥ 2.0 U/ml

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges as usually done for other diagnostic parameters, too. Therefore, the above mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

Normal range was established by evaluation of data from patients with type 1 diabetes and healthy control subjects.

## XV. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

For *in vitro* diagnostic use only. This kit contains <sup>125</sup>I (half-life: 59 days), emitting ionizing X (27 keV) and γ (35 keV) radiations.

This kit is for *in vitro* use only. Follow the working instructions carefully. This instruction manual is valid only for the present kit with the given composition. An exchange of single components is not in agreement with CE regulations.

The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. The same relates to the stability stated for reconstituted reagents.

All reagents should be kept at 2 - 8 °C before use in the original shipping container.

Some of the reagents contain small amounts (< 0.1 %) of sodium azide as a preservative. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucosa. The possible formation of heavy metal azides in the drainage has to be prevented by sufficient rinsing with water.

Source materials derived from human body fluids or organs used in the preparation of this kit were tested and found negative for both Hepatitis an HIV antibody. However, no known test guarantees the absence of such viral agents. Therefore, handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

Since the kit contains radioactive material the following precautions should be observed:

- Do not smoke, eat or drink while handling radioactive material in any room designated for working with radioactive material,
- Always use protective gloves,
- Never pipette radioactive material by mouth,
- Wipe up spills promptly, washing the affected surface thoroughly with a decontaminant,
- Place contaminated tissues, tubes, bench covers, gloves etc. in a specially marked container, discard liquid and solid radioactive waste only as permitted by federal, state or local authorities and regulations.

It is the responsibility of the user of this product to handle radioactive material in accordance to the national rules given by law or other statements of the local authorities.

In any case GLP with all general and individual regulation has to be applied to the use of this kit.

**XVI. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

1	Label test tubes*	Cals	Ctrl	Pat.-Sera 1, 2 etc.	T
2	Pipette Calibrators 1 - 5 Control I - II Patient sera	20 µl	20 µl	20 µl	
3	Pipette Tracer (prepared from Tracer and Reconstitution buffer)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
4	Incubate**	overnight (at least 18 hours) (at 4 - 8 °C)			
5	Pipette Protein A component (prepared from Protein A component and Reconstitution buffer)	50 µl	50 µl	50 µl	
6	Incubate**	60 minutes (at 4-8 °C)			
7	Pipette Cold precipitation buffer	1 ml	1 ml	1 ml	
8	Centrifuge	30 minutes at 4-8°C at 2000 x g			
9	Decant supernatant or Aspirate supernatant	leave tubes upside down on absorbent paper for minimum 5 minutes quantitatively.			
10	Count radioactivity	Counting time: 1 minute			

\* use conical tubes

\*\* Prior to incubation, agitate the tubes briefly in order to ensure homogeneous reaction conditions.

DIAsource Catalogue Nr : KIPM2050	Revision nr : 200224/1
--------------------------------------	---------------------------

Revision date : 2020-02-24

**Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>**

Lire la totalité du protocole avant utilisation.

## Anti-IA<sub>2</sub> RIA

### I. UTILISATION PRÉVUE

Test avec radioligand pour la détermination des autoanticorps anti-protéine tyrosine phosphatase IA<sub>2</sub> dans le sérum humain.

### II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. **Nom de spécialité :** Trousse de dosage radio-immunologique DIAsource Anti-IA<sub>2</sub>
- B. **Numéro de référence :** KIPM2050 : 50 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

**Pour une assistance technique ou des renseignements sur les commandes, contacter :**

**Tél. : +32 (0)10 84.99.11**

**Fax : +32 (0)10 84.99.91**

### III. CONTEXTE CLINIQUE

Le diabète de type 1, également appelé diabète insulino-dépendent, est la conséquence d'une destruction auto-immune chronique des cellules bêta sécrétrices d'insuline du pancréas ; cette affection est probablement déclenchée par l'exposition de patients génétiquement susceptibles à un agent environnemental. On estime que la destruction auto-immunitaire des cellules bêta est totalement asymptomatique jusqu'à ce que 80 % à 90 % des cellules aient été perdues. Ce processus peut prendre des années et peut survenir à tout moment.

Au cours de la phase préclinique, le processus auto-immun est caractérisé par la présence d'autoanticorps circulants dirigés contre les antigènes des cellules bêta. Ces autoanticorps sont présents plusieurs années avant l'apparition du diabète de type 1 et des symptômes cliniques. Les premières études ont utilisé le test d'immunofluorescence pour les anticorps dirigés contre les cellules des îlots pancréatiques (ICA) ; ce test a été difficile à standardiser et maintenant remplacé par une combinaison d'immunodosages des anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques des cellules bêta, tels que l'insuline (IAA), l'acide glutamique décarboxylase (GAD) et la tyrosine phosphatase ICA 512 (IA<sub>2</sub>).

IA<sub>2</sub>, appartenant à la famille des protéine-tyrosine-phosphatases, se trouve dans les granules denses des cellules bêta pancréatiques et est le second antigène recombinant défini des cellules des îlots pancréatiques. IA<sub>2</sub> partage une identité de séquences avec l'antigène 512 des cellules des îlots pancréatiques. La plus grande fréquence d'anticorps anti-IA<sub>2</sub> est expliquée par la présence d'autoanticorps dirigés contre le radical terminal COOH d'IA<sub>2</sub> qui manque dans la molécule d'ICA512.

Les autoanticorps anti-IA<sub>2</sub> sont retrouvés chez la majorité des personnes ayant un diabète de type 1 d'apparition récente et chez les personnes en phase prédiabétique. La survenue des autoanticorps anti-IA<sub>2</sub> semble être corrélée à la progression rapide vers un diabète de type 1 cliniquement évident.

La combinaison des tests des autoanticorps anti-GAD65 et anti-IA<sub>2</sub> est très pertinente pour l'évaluation du risque de diabète de type 1 chez les enfants et adolescents. La recherche des autoanticorps anti-GAD65 et anti-IA<sub>2</sub> détectent plus de 90 % des sujets à risque de diabète de type 1 et a, par conséquent, le potentiel de remplacer la technique ICA.



#### IV. PRINCIPES DE LA MÉTHODE

La trousse de dosage radio-immunologique DIASource anti-IA<sub>2</sub> est un test direct reposant sur le principe des tests à radioligands. L'IA<sub>2</sub> (fragment intracellulaire d'IA<sub>2</sub>) humain hautement purifié est marqué à l'iode 125. Ce marqueur est utilisé en excès et lié aux autoanticorps anti-IA<sub>2</sub> de l'échantillon.

Le marqueur de l'immunodosage DIASource anti-IA<sub>2</sub> répond aux exigences les plus strictes en matière de pureté, identité enzymologique, cinétique de réaction rapide, réactivité croisée au niveau zéro et stabilité. Il s'agit des principales conditions préalables à la liaison spécifique du marqueur et à sa reconnaissance exclusive par les autoanticorps anti-IA<sub>2</sub> de l'échantillon.

En ajoutant une Protéine A dissoute qui se lie avec la fraction Fc des autoanticorps, il se forme des complexes de type sandwich. En ajoutant un tampon de précipitation, le complexe immun va précipiter en phase solide, ce qui facilite la séparation simple de la fraction liée (B) par centrifugation. Après l'élimination du surnageant contenant le marqueur non lié par aspiration ou décantation, on mesure la radioactivité du précipité restant.

La concentration en autoanticorps anti-IA<sub>2</sub> dans l'échantillon est reflétée par la quantité de marqueur spécifiquement lié. Le signal radioactif (cpm) de la fraction liée (B) est proportionnel à la concentration en autoanticorps.

Aucun complexe immun ne se forme s'il n'y a pas d'autoanticorps contre IA<sub>2</sub> dans l'échantillon puisque le marqueur ne se fixe qu'aux autoanticorps IA<sub>2</sub> et pas à la Protéine A.

Une courbe de référence ayant une plage comprise entre 0,01 et 60 U/ml est établie en mesurant les cpm des pourcentages de liaisons B/T respectifs des étalons 1 à 5. La valeur de la concentration des autoanticorps anti-IA<sub>2</sub> est lue directement par comparaison avec cette courbe.

#### V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	Trousse de 50 tests	Reconstitution		
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>Ag</td> <td>125I</td> </tr> </table> <p>MARQUEUR : IA<sub>2</sub> marqué à l'iode<sup>125</sup> (humain, recombinant)</p>	Ag	125I	1 flacon Lyo < 0,1 MBq	Reconstituer avec 2,6 ml de tampon de reconstitution
Ag	125I			
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>ÉTAL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Étalons - N = 1 à 5 Étalons anti-IA<sub>2</sub> dans du sérum humain (conc. : voir l'étiquette du flacon)</p>	ÉTAL	N	5 flacons 0,25 ml	Prêt à l'emploi
ÉTAL	N			
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>PROTÉINE A</td> </tr> </table> <p>Composant de la Protéine A</p>	PROTÉINE A	1 flacon Lyo	Reconstituer avec 2,6 ml de tampon de reconstitution	
PROTÉINE A				
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>SOL.</td> <td>DE REC.</td> </tr> </table> <p>Tampon de reconstitution</p>	SOL.	DE REC.	1 flacon 6 ml	Prêt à l'emploi
SOL.	DE REC.			
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>CONTRÔLE</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Contrôles - N = 1 ou 2 Contrôles anti-IA<sub>2</sub> dans du sérum humain (conc. : voir l'étiquette du flacon)</p>	CONTRÔLE	N	2 flacons 0,25 ml	Prêt à l'emploi
CONTRÔLE	N			
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>AGENT</td> <td>PREC.</td> </tr> </table> <p>Tampon de précipitation</p>	AGENT	PREC.	1 flacon 55 ml	Prêt à l'emploi
AGENT	PREC.			

#### VI. MATÉRIEL NON FOURNI

- Pipettes de précision 20 µl 100 µl, 1000 µl
- Embouts de pipettes jetables
- Eau distillée ou désionisée
- Papier absorbant
- Vortex
- Centrifugeuse
- Compteur γ

#### VII. PRÉPARATION DU RÉACTIF

Laisser tous les composants revenir à température ambiante avant de les utiliser pour le test, à l'exception du tampon de précipitation.

##### Marqueur :

Reconstituer avec 2,6 ml de tampon de reconstitution pour un flacon. Le marqueur reconstitué reste stable pendant 2 semaines, conservé entre 2 °C et 8 °C

##### Tampon de reconstitution :

Le tampon de reconstitution est prêt à l'emploi et sert à la reconstitution du marqueur et du composant de la Protéine A.

##### Tampon de précipitation :

Le tampon de précipitation est prêt à l'emploi et sert à la précipitation et au lavage du complexe immun radioactif. **Utiliser froid.**

##### Composant de la Protéine A :

Reconstituer avec 2,6 ml de tampon de reconstitution pour un flacon. La solution reconstituée reste stable pendant 2 semaines, conservée entre 2 °C et 8 °C

##### Étalons :

Prêts à l'emploi.

##### Contrôles :

Prêts à l'emploi.

#### VIII. CONSERVATION ET DATES DE PÉREMPTION DES RÉACTIFS

La trousse DIASource anti-IA<sub>2</sub> a été conçue pour 50 déterminations. Cela est suffisant pour l'analyse de 18 échantillons inconnus ainsi que pour les étalons et sérums de contrôle testés en double.

La date d'expiration de chaque élément est indiquée sur chaque étiquette et sur celle de la trousse complète sur la boîte.

À réception, tous les composants de la trousse DIASource anti-IA<sub>2</sub> doivent être conservés à une température de 2 °C à 8 °C, préférablement dans la boîte d'origine.

#### IX. COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

- Le sang est prélevé par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum est séparé par centrifugation. Du plasma peut être aussi utilisé avec la trousse DIASource anti-IA<sub>2</sub>. Les échantillons hémolysés ou lipémiques ne doivent pas être utilisés.

- Les échantillons peuvent être conservés jusqu'à trois jours à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. En cas de conservation prolongée, la température requise est de -20 °C.

- Il faut éviter les cycles répétés de congélation-décongélation. Pour des utilisations multiples, aliquoter des échantillons au départ et les conserver à -20 °C

#### X. PROCÉDURE

**Utiliser des tubes coniques pour la trousse DIASource anti-IA<sub>2</sub> uniquement.**

1. Étiqueter les tubes à essais correctement.
2. Pipetter dans les tubes correspondants selon le plan du test
  - a. 20 µl d'étalons,
  - b. 20 µl de sérums de contrôle,
  - c. 20 µl d'échantillons de patients, chacun.
3. Ajouter 50 µl de marqueur (préparé à partir du marqueur et du tampon de reconstitution) dans tous les tubes, y compris les tubes pour radioactivité totale.  
*Les tubes T sont maintenant séparés jusqu'à la mesure de la radioactivité.*
4. Incuber jusqu'au lendemain (au moins 18 heures entre 4 °C et 8 °C).

5. Ajouter 50 µl de solution de Protéine A (préparée à partir du composant de la Protéine A et du tampon de reconstitution) dans chaque tube. (Agiter délicatement le mélange avant utilisation - veuillez consulter la section VII. Préparation du réactif avant utilisation).
6. Incuber 60 minutes (entre 4 °C et 8 °C).
7. Ajouter 1 ml de tampon de précipitation froid dans chaque tube.
8. Centrifuger les tubes pendant 30 minutes à une température comprise entre 4 °C et 8 °C à 2000 g.
9. Aspirer complètement le surnageant ou décanter. Pour l'élimination de tout liquide restant, retourner les tubes verticalement (pendant 5 minutes minimum) et absorber soigneusement toutes les gouttes en tapotant doucement sur un papier absorbant.
10. Mesurer la radioactivité de tous les tubes.  
Durée de mesure recommandée : 1 minute

## XI. CALCUL DES RÉSULTATS

La courbe de référence est établie en marquant les valeurs moyennes de cpm des étalons 1 à 5 sur l'axe des ordonnées (axe y) par rapport aux concentrations respectives d'anticorps anti-IA<sub>2</sub> sur l'axe des abscisses (axe x). Les taux de liaison B respectifs, en rapport avec la radioactivité totale T, peuvent aussi être utilisés pour établir la courbe de référence (% B/T).

**L'utilisation d'un traitement log/log est recommandé pour obtenir de meilleurs résultats !**

Les concentrations d'anticorps anti-IA<sub>2</sub> des contrôles et des échantillons inconnus sont lues directement en U/ml contre les valeurs respectives de cpm ou B/T.

La trousse DIASource anti-IA<sub>2</sub> peut aussi être utilisée avec une analyse assistée par ordinateur utilisant un logiciel capable de tracer des courbes log/log avec lissage de courbe, comme pour les tests de type sandwich (IRMA).

## XII. DONNÉES TYPES

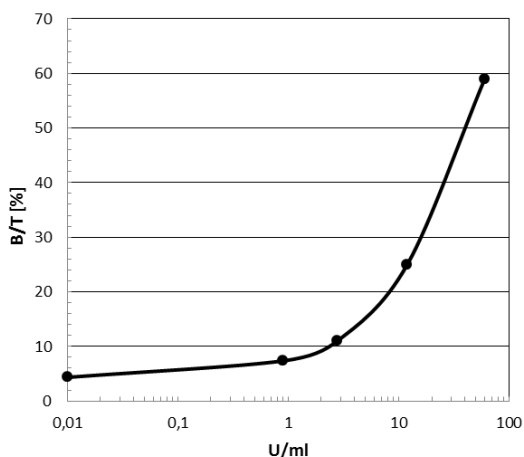
Les données suivantes sont fournies uniquement à titre d'illustration et ne devront jamais être utilisées à la place de la courbe d'étalonnage en temps réel.

Tubes à essai	cpm (a)	cpm (b)	cpm (moyenne)	% B/T	U/ml
Activité totale T	60 029	58 617	59 323	100 %	---
Étalon 1	2 526	2 606	2 566	4,3	0,01
Étalon 2	4 338	4 379	4 359	7,3	0,5
Étalon 3	6 621	6 459	6 540	11,0	2,5
Étalon 4	14 858	14 822	14 840	25,0	12
Étalon 5	34 776	35 136	34 956	58,9	60
Patient 1	8 253	8 245	8 249	13,9	4,0

Calcul pour l'échantillon 1 de patient :

$$\frac{B}{T} (\%) = \frac{8249}{59323} \times 100 = 13,9\%$$

Courbe de référence type :



## XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

### A. Limite de détection

La définition la plus appropriée et statistiquement raisonnable de la limite inférieure de définition de tout test est ce qu'on appelle actuellement la sensibilité fonctionnelle du test.

Cette sensibilité fonctionnelle du test représente généralement la concentration correspondant aux coefficients de variation de 10 % (intra test) et de 20 % (inter tests) des profils respectifs de précision du test dans la plage de plus faible concentration. Lorsque la trousse DIASource anti-IA<sub>2</sub> est correctement utilisée pour une performance maximum, cette valeur est d'approximativement 0,8 U/ml.

Les valeurs des anticorps anti-IA<sub>2</sub> inférieures à ce niveau de sensibilité fonctionnelle ne répondent pas aux critères statistiques de fiabilité selon les BPL (Bonnes pratiques de laboratoire) et ne peuvent donc pas être distinguées du zéro en raison de la certitude statistiquement nécessaire.

Les concentrations d'anticorps anti-IA<sub>2</sub> supérieures à 0,8 U/ml, approximativement, répondent en revanche à ces critères et sont par conséquent jugées valides.

Échantillon	Intra-test		Inter-tests	
	Moyenne (U/ml)	CV (%)	Moyenne (U/ml)	CV (%)
1	0,76	10,4	0,92	17,0
2	5,80	4,2	6,13	2,9
3	24,68	2,6	24,76	1,9

### B. Spécificité

La haute qualité du marqueur (<sup>125</sup>I-IA<sub>2</sub>) garantit une réaction exclusive des autoanticorps anti-IA<sub>2</sub> dans le principe de test direct. Il n'existe aucune réactivité croisée détectable avec des autoanticorps dirigés contre l'insuline, la thyroglobuline, la peroxydase thyroïdienne, le récepteur du TSH et le récepteur de l'acétylcholine.

### C. Étalonnage

Les unités utilisées pour la trousse DIASource anti-IA<sub>2</sub> sont des unités arbitraires.

Le test DIASource anti-IA<sub>2</sub> basé sur <sup>125</sup>I-IA<sub>2</sub> présente une bonne corrélation avec un test de référence reconnu. La sensibilité et la spécificité présentent un consensus de 100 %.

### D. Parallélisme entre les normes et les échantillons de sérum

Les dilutions des échantillons de sérum humain sans anticorps anti-IA<sub>2</sub> sont déterminées selon leurs valeurs théoriques attendues avec le test DIASource anti-IA<sub>2</sub> M.

Compte tenu de la nature hétérogène de la population d'autoanticorps dans le sérum humain et considérant la spécificité de l'épitope et l'affinité des autoanticorps, la dilution de l'échantillon peut - dans certains cas - ne pas conduire à la valeur théorique attendue.

### E. Limites

Chez des sujets en bonne santé, le test effectué au moyen du test DIASource anti-IA<sub>2</sub> devrait être négatif. Toutefois, des autoanticorps anti-IA<sub>2</sub> peuvent aussi être présents dans un syndrome neurologique rare, le syndrome de l'homme raide. Les autoanticorps anti-IA<sub>2</sub> sont rarement observés dans le sérum de patients atteints du syndrome de l'homme raide. Aucun diagnostic clinique ne doit être basé uniquement sur les résultats d'une méthode de diagnostic in vitro. Les médecins sont supposés prendre en compte toutes les constatations cliniques et biologiques possibles pour établir un diagnostic.

#### XIV. INTERVALLES DE RÉFÉRENCE

Anti-IA <sub>2</sub>	
Anticorps anti-IA <sub>2</sub> négatifs	< 1,0 U/ml
Anticorps anti-IA <sub>2</sub> limites	1,0 à 2,0 U/ml
Anticorps anti-IA <sub>2</sub> positifs	≥ 2,0 U/ml

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre plage de références normales et pathologiques comme cela se fait aussi pour d'autres paramètres diagnostiques. Par conséquent, les valeurs de référence mentionnées ci-dessus ne constituent un guide que par rapport aux valeurs qui pourraient être attendues.

La plage normale a été établie par l'évaluation de données provenant de patients ayant un diabète de type 1 et de sujets contrôles en bonne santé.

#### XV. PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE

##### Sécurité

Pour diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de I<sup>125</sup>I (demi vie : 59 jours) émettant des radiations ionisantes X (27 keV) et γ (35 keV).

Cette trousse est réservée à un usage diagnostique *in vitro* uniquement. Suivre soigneusement les consignes de travail. Ce manuel d'instructions n'est valide que pour la présente trousse et les composants indiqués. L'échange de composants uniques n'est pas conforme à la réglementation CE.

Les dates de péremption indiquées sur chacune des étiquettes doivent être respectées. La même règle s'applique à la stabilité indiquée pour les agents reconstitués.

Tous les réactifs doivent être conservés entre 2 °C et 8 °C avant utilisation dans leur boîte d'expédition d'origine.

Certains réactifs contiennent de petites quantités (< 0,1 %) d'azote de sodium à titre de conservateur. Ils ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou des muqueuses. La formation possible d'azotures de métaux lourds dans les canalisations d'évacuation doit être évitée par un rinçage à grande eau.

Les matériaux sources provenant de fluides corporels ou d'organes humains utilisés dans la préparation de cette trousse ont été testés et déclarés négatifs pour l'hépatite et l'anticorps du VIH. Cependant, aucun test connu ne peut garantir l'absence de tels agents viraux. Par conséquent, tous les composants et tous les échantillons de patients doivent être manipulés comme s'ils présentaient un danger potentiel.

Considérant que certaines trousse contiennent du matériel radioactif, les précautions suivantes doivent être observées :

- Ne pas fumer, manger ou boire pendant la manipulation de matériel radioactif dans une pièce conçue pour travailler avec ce matériel radioactif.
- Toujours utiliser des gants protecteurs.
- Ne jamais pipetter du matériel radioactif à la bouche.
- Essuyer sans retard toutes éclaboussures, et laver abondamment la zone concernée avec un produit décontaminant.
- Placer les chiffons, tubes, couvertures de paillasses, gants, etc. contaminés dans un contenant spécialement identifié, éliminer les déchets radioactifs liquides et solides dans le strict respect des réglementations fédérales, de l'état ou des autorités locales.

Il incombe à l'utilisateur de ce produit de manipuler le matériau radioactif conformément aux règles nationales établies par la loi ou aux autres décisions des autorités locales.

En toutes circonstances, les BPL et toutes les réglementations générales et individuelles doivent être appliquées à l'utilisation de cette trousse.

#### XVI. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

1	Étiqueter les tubes à essai*	Étalons	Contrôles	Sérums de patients 1, 2, etc.	T
2	Pipette	Étalons 1 à 5 Contrôle I - II Sérum de patient	20 µl	20 µl	20 µl
3	Pipette	marqueur (préparé à partir du marqueur et du tampon de reconstitution)	50 µl	50 µl	50 µl
4	Incuber**	jusqu'au lendemain (au minimum 18 heures) (entre 4 °C et 8 °C)			
5	Pipette	Composant de la Protéine A (préparé à partir du composant de la Protéine A et du tampon de reconstitution)	50 µl	50 µl	50 µl
6	Incuber**	60 minutes (entre 4 °C et 8 °C)			
7	Pipette	Tampon de précipitation froid	1 ml	1 ml	1 ml
8	Centrifuger	30 minutes entre 4 °C et 8 °C à 2000 g			
9	Décanté le surnageant ou Aspirer le surnageant	laisser les tubes renversés sur un papier absorbant pendant au moins 5 minutes. quantitativement.			
10	Compter la radioactivité	Durée de mesure : 1 minute			

\* utiliser des tubes coniques

\*\* Avant l'incubation, agiter brièvement les tubes afin d'assurer des conditions de réaction homogènes.

Numéro catalogue DIASource : KIPM2050	Num. révision : 200224/1
--	-----------------------------

Date de révision : 2020-02-24



es

Leer todo el protocolo antes de utilizar.

## Anti-IA<sub>2</sub> RIA

### I. USO PREVISTO

Ensayo de Radioligando para la determinación de auto-anticuerpos contra la proteína tirosina fosfatasa (IA<sub>2</sub>) en suero humano.

### II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre registrado:** DIAsource Anti-IA<sub>2</sub> RIA Kit
- B. **Número de catálogo:** KIPM2050: 50 pruebas
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para obtener asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con :  
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

### III. INDICACION DE USO

La diabetes tipo 1, también conocida como diabetes mellitus insulina dependiente (IDDM), se desarrolla a partir de una destrucción crónica de origen autoinmune de las células beta pancreáticas encargadas de la secreción de insulina, iniciada probablemente por la exposición de un portador genéticamente susceptible a un agente ambiental. Esta destrucción de tipo auto-inmune ocurre de manera asintomática hasta la destrucción de un 80 a 90% de las células beta pancreáticas. Este proceso puede tomar varios años y puede iniciarse en cualquier momento de la vida.

Durante la fase pre-clínica, este proceso auto-inmune está caracterizado por la circulación de auto-anticuerpos contra antígenos de las células beta. Estos auto-anticuerpos están presentes años antes de la aparición de la diabetes tipo 1 y antes de la aparición de síntomas clínicos. Anteriormente se utilizaba una prueba de inmunofluorescencia para la determinación de anticuerpos contra las células islote de Langerhans (ICA), la cual ha sido difícil de estandarizar, por lo cual ha sido reemplazada por la combinación de varios radioinmunoensayos para la determinación de anticuerpos contra antígenos específicos de las células beta, tales como insulina (IAA), ácido glutámico descarboxilasa (GAD) y tirosina fosfatasa ICA 512 (IA<sub>2</sub>). Esta última -de la familia de las tirosinas fosfatasas- se localiza en los gránulos densos de las células beta pancreáticas, y es el segundo antígeno recombinante reconocido en las células islote. IA<sub>2</sub> comparte secuencias de identidad con el antígeno de células de islote 512. La mayor frecuencia de anticuerpos contra IA<sub>2</sub> se explica por la presencia de anticuerpos dirigidos contra la terminación COOH del IA<sub>2</sub>, ausentes en la molécula ICA 512.

Anticuerpos contra IA<sub>2</sub> están presentes en la mayoría de individuos con diabetes tipo I de reciente aparición y en individuos en fase pre-diabética. El desarrollo de auto-anticuerpos contra IA<sub>2</sub> parece estar correlacionado con la rápida progresión hacia una diabetes tipo 1 manifiesta.

La combinación de pruebas para auto-anticuerpos GAD<sub>65</sub> y IA<sub>2</sub> es altamente relevante en la valoración de riesgo de desarrollo de diabetes tipo 1 en niños y adolescentes. El tamizaje para GAD<sub>65</sub> y IA<sub>2</sub> detecta más del 90% de individuos con riesgo de desarrollar diabetes tipo 1, teniendo así el potencial para reemplazar la técnica de ICA.

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

DIASource anti-IA<sub>2</sub> es un ensayo directo basado en el principio de los ensayos de radioligando. Se utiliza como trazador IA<sub>2</sub> recombinante humano (fragmento intracelular de IA<sub>2</sub>) altamente purificado marcado con el yodo radiactivo <sup>125</sup>I. Este trazador se utiliza en exceso y se une a los autoanticuerpos anti-IA<sub>2</sub> de la muestra.

El trazador DIASource anti-IA<sub>2</sub> cumple con los requerimientos más exigentes en relación con la pureza, identidad enzimológica, rapidez en la cinética de la reacción, reacción cruzada a nivel cero y estabilidad. Estos son los pre-requisitos principales para la unión específica del trazador y su exclusivo reconocimiento por los autoanticuerpos anti-IA<sub>2</sub> presentes en la muestra.

Después de la adición de Proteína A disuelta, que se une a la región Fc de los autoanticuerpos, tiene lugar la formación de un complejo tipo sándwich. Con la adición de un tampón de precipitación el complejo precipita como fase sólida, simplificando la separación de la fracción unida (B) por centrifugación. Tras la separación del sobrenadante por aspiración o decantación, que contiene el trazador no unido, se mide la radioactividad del precipitado.

La concentración de autoanticuerpos IA<sub>2</sub> (anti-IA<sub>2</sub>) se refleja por la cantidad de trazador unido específicamente. La señal radioactiva (cpm) de la fracción unida (B) es proporcional a la concentración de autoanticuerpos.

Si los autoanticuerpos contra la IA<sub>2</sub> están ausentes, no tiene lugar la formación del inmunocomplejo, ya que el trazador se une únicamente a los autoanticuerpos anti- IA<sub>2</sub>, pero no a la Proteína A.

Se establece una curva estándar, por la medición de la relación B/T % de los calibradores 1-5. En esta curva se extrapola directamente el valor de la concentración de anti-IA<sub>2</sub> de las muestras de los pacientes.

#### V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	50 pruebas Kit	Reconstitución		
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Ag</td> <td style="padding: 2px;">125I</td> </tr> </table> <p>Trazador: <sup>125</sup>Iodine IA<sub>2</sub> (recombinante humano)</p>	Ag	125I	1 vial Lio <0.1 MBq	<b>Reconstituir</b> con 2,6 ml de Tampón de reconstitución
Ag	125I			
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 2px;">CAL</td> <td style="padding: 2px;">N</td> </tr> </table> <p>Calibradores - N = 1 to 5 Anti- IA<sub>2</sub> Calibradores en suero humano (conc: ver hoja adjunta)</p>	CAL	N	5 viales 0,25ml	<b>Listo</b> para usar
CAL	N			
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 2px;">PROTEIN A</td> </tr> </table> <p>Proteína A</p>	PROTEIN A	1 vial Lyo	<b>Reconstituir</b> con 2,6 ml de Tampón de reconstitución	
PROTEIN A				
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 2px;">REC</td> <td style="padding: 2px;">SOLN</td> </tr> </table> <p>Tampón de reconstitución</p>	REC	SOLN	1 vial 6 ml	<b>Listo</b> para usar
REC	SOLN			
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 2px;">CONTROL</td> <td style="padding: 2px;">N</td> </tr> </table> <p>Controles - N = 1 or 2 Anti- IA<sub>2</sub> controles en suero humano (conc: ver hoja adjunta)</p>	CONTROL	N	2 viales 0,25ml	<b>Listo</b> para usar
CONTROL	N			
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 2px;">PREC</td> <td style="padding: 2px;">AGENT</td> </tr> </table> <p>Tampón de precipitación</p>	PREC	AGENT	1 vial 55ml	<b>Listo</b> para usar
PREC	AGENT			

#### VI. MATERIALES NO SUMINISTRADOS

- pipetas de precisión 20 - 100 µl, 1000 µl
- puntas desechables
- agua destilada o desionizada
- papel adsorbente
- Agitador vórtex
- centrifuga
- contador gamma

#### VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Todos los componentes deben alcanzar la temperatura ambiente antes de su utilización, **excepto el tampón de precipitación.**

##### Trazador:

Reconstituir con 2,6 ml de Tampón de reconstitución.

El trazador reconstituido permanece estable durante 2 semanas, conservar de 2-8 °C.

##### Tampón de reconstitución:

El tampón de reconstitución está listo para usar y sirve para reconstituir el trazador y la proteína A.

##### Tampón de precipitación:

El tampón de precipitación está listo para usar y sirve para la precipitación y el lavado del inmunocomplejo radioactivo. **¡Usar frío!**

##### Proteína A:

Reconstituir con 2,6 ml de tampón de reconstitución.

La suspensión reconstituida permanece estable durante 2 semanas si se conserva entre 2 - 8 °C.

##### Calibradores:

Listo para usar.

##### Controles:

Listo para usar.

#### VIII. ALMACENAJE Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

El kit DIASource anti-IA<sub>2</sub> M se ha diseñado para 50 determinaciones. Esta presentación es suficiente para el análisis de 18 muestras desconocidas así como para los calibradores y sueros control, ensayados por duplicado.

La fecha de caducidad de cada uno de los componentes se indica en su etiqueta respectiva y la del kit completo en la etiqueta externa del envase. A su recepción, conservar todos los componentes del kit DIASource anti-IA<sub>2</sub> entre 2-8 °C, preferentemente en su envase original.

#### VIX. TOMA DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN

##### Extracción y conservación de las muestras

La sangre se extrae por venopunción. Tras el periodo de coagulación se separa el suero por centrifugación. El plasma también es apropiado para su utilización en el kit DIASource anti-IA<sub>2</sub>. No deben utilizarse muestras con un elevado contenido en lípidos ni hemolizadas.

Las muestras pueden conservarse de 2-8 °C hasta tres días. Para periodos prolongados conservar a - 20 °C.

Deben evitarse ciclos repetidos de congelación/descongelación. Para uso reiterado, alicuotar las muestras a su recepción y conservar a - 20 °C.

#### X. PROCEDIMIENTO

##### Utilizar tubos cónicos únicamente para DIASource anti-IA<sub>2</sub> M.

1. Rotular adecuadamente los tubos
  2. De acuerdo con el esquema de la técnica, añadir en los tubos que corresponda los siguientes componentes:
    - 20 µl de calibradores,
    - 20 µl de suero control,
    - 20 µl de cada una de las muestras de los pacientes
  3. Añadir 50 µl de trazador (preparado a partir de Trazador y Tampón de reconstitución), **a cada uno de los tubos**, incluyendo aquellos para la medición de la radioactividad total **T**
- Los tubos T en este momento se separan hasta la medición de la radioactividad
4. Incubar durante la noche (por lo menos 18 horas a 4-8 °C)
  5. Añadir 50 µl de la solución de proteína A (preparada a partir de Proteína A y Tampón de reconstitución) a cada tubo (Agitar el preparado con cuidado previamente a su utilización.- Se recomienda consultar la sección Componentes del Test, antes de su preparación)
  6. Incubar durante 60 min. a 4 - 8 °C
  7. Añadir 1ml de tampón de precipitación **frío**, a cada tubo
  8. Centrifugar los tubos durante 30 minutos a 2000 x g (4 - 8 °C)
  9. Aspirar completamente el sobrenadante o decantar. Para eliminar completamente cualquier líquido remanente invertir los tubos completamente (**al**

menos 5 min.) y absorber cualquier gota sacudiendo el tubo suavemente sobre papel absorbente

10. Medir la radioactividad de **todos los tubos incluyendo el tubo T**. Tiempo de conteo recomendado: 1 minuto

#### XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

La curva estándar se establece situando los valores de la media de las cpm o preferiblemente los valores respectivos del nivel de unión B en relación con la radioactividad total T (% B/T) de cada uno de los calibradores 1 - 5 en las ordenadas, eje-y, frente a sus concentraciones respectivas de anti GAD65 en las abscisas, eje-x.

También puede utilizarse para la realización de la curva estándar, los valores respectivos del nivel de unión B en relación con la radioactividad total T (% B/T).

**Para mejorar los resultados se recomienda un procesamiento log/log!**

Las concentraciones de anti-IA<sub>2</sub> de los controles y de las muestras desconocidas se extrapolan directamente en U/ml a partir de sus valores respectivos en cpm o B/T.

El ensayo DIASource anti-IA<sub>2</sub> M puede también utilizarse con un software capaz de diseñar curvas log/log con una pendiente suavizada como ocurre con los ensayos tipo sándwich (IRMA).

#### XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

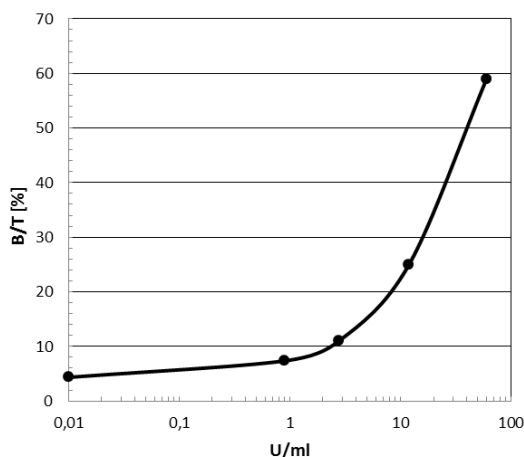
**¡No utilizar para la evaluación!**

Tubos	cpm (a)	cpm (b)	cpm (mean)	B/T %	U/ml
Total activity T	60029	58617	59323	100 %	---
Calibrador 1	2526	2606	2566	4.3	0.01
Calibrador 2	4338	4379	4359	7.3	0.5
Calibrador 3	6621	6459	6540	11.0	2.5
Calibrador 4	14858	14822	14840	25.0	12
Calibrador 5	34776	35136	34956	58.9	60
Paciente 1	8253	8245	8249	13.9	4.0

Cálculo de la muestra del paciente 1:

$$\frac{B}{T} (\%) = \frac{8249}{59323} \times 100 = 13,9\%$$

Curva estándar:



#### XIII. RENDIMIENTO Y LIMITACIONES

##### A. Límite de la detección

La definición más apropiada y estadísticamente más razonable del límite de detección de cualquier ensayo, es en la actualidad, la llamada **sensibilidad funcional del ensayo**.

Esta sensibilidad funcional del ensayo representa la concentración que se corresponde con el coeficiente de variación (intra-ensayo) del 10 % y con el coeficiente de variación (inter-ensayo) del 20 %, en las respectivas precisiones del

ensayo, en el rango de concentraciones bajas. En un ensayo de DIASource anti-IA<sub>2</sub> M correcto este valor se encuentra aproximadamente en 0,8 U/ml.

Valores de anti-IA<sub>2</sub> obtenidos por debajo del nivel definido de sensibilidad funcional del ensayo no cumplen los criterios estadísticos de fiabilidad de acuerdo con las buenas prácticas del laboratorio (BPL) y por tanto no se pueden distinguir de cero, con certeza estadística.

Concentraciones de anti-IA<sub>2</sub> superiores a la concentración aproximada de 0,8 U/ml, sin embargo, cumplen con estos criterios y por lo tanto deben considerarse como válidas.

Nr.	Intra-ensayo		Inter-ensayo	
	Media (U/ml)	CV (%)	Media (U/ml)	CV (%)
1	0.76	10.4	0.92	17.0
2	5.80	4.2	6.13	2.9
3	24.68	2.6	24.76	1.9

##### B. Especificidad

La elevada calidad del trazador (125I-IA<sub>2</sub>) asegura que en el ensayo únicamente reaccionan los autoanticuerpos anti-IA<sub>2</sub> y que no tiene lugar ninguna reacción cruzada con autoanticuerpos frente a anti-GAD65, insulina, tiroglobulina, tiroperoxidasa, el receptor de la TSH y frente al receptor de acetilcolina.

##### C. Calibration

Las unidades en el kit DIASource anti-IA<sub>2</sub> son unidades arbitrarias.

El ensayo DIASource anti-IA<sub>2</sub> se basa con buen acuerdo con un ensayo ya establecido de referencia. La sensibilidad y especificidad muestra un consenso de 100%.

##### D. Paralelismo entre los estándares y las muestras

Las diluciones de las muestras con suero humano, libre de anti-IA<sub>2</sub>, se determinan de acuerdo con los valores teóricos esperados con el kit DIASource anti-IA<sub>2</sub>.

En base a la naturaleza heterogénea de la población de autoanticuerpos en el suero humano, y a la vista de la especificidad del epítipo y a la afinidad de los autoanticuerpos, en algunos casos no se encuentran los valores teóricos esperados.

##### E. Limitaciones

El resultado del ensayo DIASource anti-IA<sub>2</sub>, en individuos sanos, debería ser negativo.

Sin embargo, raramente, pueden estar presentes autoanticuerpos anti-IA<sub>2</sub> en algunos casos del síndrome de la persona rígida (SPR), una alteración neurológica poco frecuente.

Ningún diagnóstico clínico debería basarse únicamente en los resultados de un método para diagnóstico in vitro. Se presupone que los facultativos tienen en cuenta todos los parámetros clínicos y de laboratorio para establecer un diagnóstico.

#### XIV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Anti-IA <sub>2</sub>	
Negativo para IA <sub>2</sub> -Ac	< 1.0 U/ml
Incierto para IA <sub>2</sub> -Ac	1.0 – 2.0 U/ml
Positivo para IA <sub>2</sub> -Ac	≥ 2.0 U/ml

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad y patológicos, como generalmente se realiza para otros parámetros diagnósticos. Así pues, los valores de referencia mencionados anteriormente deben considerarse únicamente como una guía de los valores que pudieran obtenerse

Los rangos de normalidad se establecieron de la evaluación de los datos de pacientes con diabetes de tipo 1 y controles sanos de control.

#### XV. PRECAUTIONS AND WARNINGS

t<sub>1/2</sub> = 59 días, radiación X,

(27 keV) and radiación gamma (35 keV)

Este kit es únicamente para su utilización in vitro.  
Ajustarse rigurosamente al protocolo de trabajo.

Deben tenerse en cuenta las fechas de caducidad indicadas en cada etiqueta.  
También indican la estabilidad de los reactivos tras su reconstitución.

No utilizar o mezclar reactivos de diferentes lotes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

\* Evitar retrasos en los tiempos indicados debido a los pipeteos.  
Todos los reactivos deberían conservarse, de 2 a 8 °C, antes de su utilización en su envase original.

Algunos de los reactivos contienen una pequeña cantidad de azida sódica como conservante (< 0.1% p/p). No deben ingerirse ni entrar en contacto con la piel y mucosas.

Las materias primas utilizadas en la preparación de este kit, derivadas de los fluidos corporales o de órganos humanos, han sido analizados, con resultados negativos, para el HbsAg, para el VIH y para anticuerpos frente al VCH. Sin embargo no se conoce ningún test que garantice la ausencia de estos agentes virales. Así pues todos los componentes y muestras de los pacientes deben manipularse como potencialmente peligrosos.

Debido a que el kit contiene materiales potencialmente peligrosos, deben tenerse en cuenta las siguientes precauciones:

- No fumar, comer o beber mientras se manipulan los componentes del kit.
- Utilizar siempre guantes de protección.
- No pipetear nunca con la boca.
- Limpiar rápidamente si hay algún escape de material, lavando vigorosamente la zona afectada con un descontaminante.

En cualquier caso, deberán tenerse en cuenta las buenas prácticas de laboratorio (BPL) en la utilización de este reactivo así como la normativa general e individual.

## XVI. RESUMEN DEL PROTOCOLO

1	Rotular los tubos*	Cals	Ctrl	Pat.-Suero 1, 2 etc.	T
2	Pipetear Calibrators 1 - 5 Control I - II Patient sera	20 µl	20 µl	20 µl	
3	Pipetear Tracer (prepared from Tracer and Reconstitution buffer)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
4	Incubar **	Por lo menos <b>18 horas</b> (a 4 - 8 °C)			
5	Pipetear Protein A component (prepared from Protein A component and Reconstitution buffer)	50 µl	50 µl	50 µl	
6	Incubate**	60 minutos (a 4-8 °C)			
7	Pipetear Cold precipitation buffer	1 ml	1 ml	1 ml	
8	Centrifugar	30 minutos at 4-8°C at 2000 x g			
9	Decantar or Aspirar sobrenadante	Dejar escurrir los tubos invertidos sobre papel absorbente al menos 5 minutos Cuantitativamente.			
10	Contaje de la radioactividad	Tiempo de contaje: 1 minuto			

\* Utilizar tubos cónicos

\*\* Previo a la incubación, agitar los tubos brevemente para asegurar unas condiciones de reacción homogéneas

DIAsource Catalogue Nr : KIPM2050	Revision nr : 200224/1
--------------------------------------	---------------------------

Revision date : 2020-02-24