



Anti-IA2

pour analyses de routine

Test ELISA quantitatif pour l'identification des auto-anticorps circulants contre les antigènes protéine tyrosine phosphatase

IVD



LOT

Voir étiquette externe

2°C  8°C



$\Sigma = 96$ déterminations

REF 39827

UTILISATION PREVUE

L'Anti-IA2 est une méthode immunoenzymatique pour la détermination quantitative des auto-anticorps contre la protéine tyrosine phosphatase (Ab IA2) dans le sérum humain.

1. SIGNIFICATION CLINIQUE

Le diabète de type 1, aussi connu comme mellitus insulino-dépendant (IDDM), est caractérisé par la destruction auto-immunitaire chronique des cellules bêta qui sécrètent l'insuline. Cette pathogenèse est probablement due à l'exposition de sujets génétiquement susceptibles à des agents environnementaux. On pense que la destruction auto-immunitaire des cellules bêta pancréatiques est complètement asymptomatique jusqu'à la perte de 80-90% des cellules. Ce processus peut commencer à tout âge et peut durer des années avant d'être complètement achevé. Durant la phase préclinique, ce processus auto-immunitaire peut être mis en évidence par la présence d'auto-anticorps circulants contre les antigènes des cellules pancréatiques bêta. Les premières études basées sur des techniques d'immunofluorescence pour mettre en évidence les anticorps contre les cellules des îlots (ICA) étaient difficile à standardiser et ont été remplacées par une combinaison de différents dosages RIA pour la détermination des anticorps contre les antigènes des cellules bêta, tels que l'insuline (IAA), l'acide glutamique décarboxylase (GAD) et la tyrosine phosphatase ICA512.

Les IA2, membres de la famille des tyrosines phosphatases, se trouvent dans les granules denses des cellules bêta pancréatiques. Les IA2 partagent une identité de séquence avec l'antigène 512 des cellules des îlots. La fréquence plus élevée des anticorps contre les IA2 s'explique par la présence des auto-anticorps dirigés vers le groupe terminal COOH de IA2 qui est absent dans les molécules ICA512.

Les auto-anticorps IA2 se trouvent en grande majorité chez les individus avec un développement récent de diabète de type 1 et chez les individus dans la phase pré-diabétique de la maladie. L'apparition des anticorps anti-IA2 semble être liée à la progression rapide et évidente du diabète de type 1.

La combinaison de tests pour les auto-anticorps GAD65 et IA2 est très importante pour l'évaluation du risque de diabète de type 1 chez les enfants et les adolescents. Le screening pour les auto-anticorps GAD65 et IA2 révèle plus de 90 % des sujets à risque pour le diabète de type 1 et peut être capable de remplacer la technique ICA.

2. PRINCIPE DE LA METHODE

Le principe du test se base sur la capacité des auto-anticorps IA2 d'agir de façon bivalente et de former un pont entre la IA2 immobilisée dans les puits et la biotine-IA2 en phase liquide.

Dans la première phase, les auto-anticorps des échantillons se fixent à l'IA2 immobilisée dans les micropuits. Dans la deuxième phase, la Biotine-IA2 se fixe à son tour à ce complexe. La Biotine-IA2 fixée est proportionnelle à la quantité d'auto-anticorps IA2 dans le sérum du patient. La biotine-IA2 non fixée est éliminée par lavage. La biotine-IA2 fixée peut être quantifiée par ajout de Streptavidine-peroxydase et d'un substrat chromogénique (TMB) avec lecture successive de la densité optique (DO) à 450 nm

3. REACTIFS, MATERIELS ET EQUIPEMENT

3.1. Réactifs et matériels fournis dans le kit

- Standards anti-IA2 (4 x 1 flacon = 0,7 mL)

STD1	REF DCE002/8407-0
STD2	REF DCE002/8408-0
STD3	REF DCE002/8409-0
STD4	REF DCE002/8410-0
- Contrôles (2 x 0,7 mL)

Contrôle négatif IA2	REF DCE045/8401-0
Contrôle positif IA2	REF DCE045/8402-0
- Enhancer (1 flacon) 4 mL **REF DCE052-0**
- Streptavidine-perox (0.7 mL) **REF DCE041/8441-0**
- Diluant Strept-perox (1 flacon) 15 mL **REF DCE048/8448-0**
- Biotine (3 flacons lyoph.) **REF DCE019/8419-0**
- Diluant Biotine (2 flacons) 15 mL **REF DCE047/8447-0**
- Microplaque recouverte (1 microplaque fractionnable)
Microplaque recouverte d'IA2 humaine recombinante **REF DCE002/8403-0**
- Solution substrat (1 flacon) 15 mL **REF DCE004/8404-0**
- Solution d'arrêt (1 flacon) 12 mL **REF DCE005/8405-0**
Acide sulfurique 0,25M
- Solution de lavage Conc. 10X (1 flacon) 125 mL **REF DCE006/8406-0**

3.2. Réactifs nécessaires non fournis dans le kit

Eau distillée ou désionisée.

3.3. Matériel et équipement auxiliaire

Distributeurs automatiques.
Lecteur pour microplaque.

4. PRECAUTIONS

- Ce kit est uniquement pour diagnostic in vitro.
- Suivre attentivement les instructions.

- Respecter la date d'échéance présente sur l'étiquette.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Ne pas utiliser de réactifs d'autres fournisseurs.
- Il est important que le temps de réaction de chaque puit soit le même pour la reproductibilité des résultats ; il est donc conseillé d'éviter le time shifting durant la distribution des réactifs.
- Tous les réactifs doivent être conservés dans le récipient d'origine entre 2-8°C avant l'utilisation.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités (< 0.1 % p/p) d'azide de sodium comme conservateur. Eviter le contact avec la peau ou les muqueuses.
- Les matériels d'origine humaine utilisés pour la préparation de ce kit ont été analysés et sont non réactifs aux HIV 1 et 2 et aux anticorps HCV et Hbs Ag, mais doivent quand même être traités comme potentiellement infectés.
- Dans tous les cas, toutes les règles relatives à la protection générale et individuelle pour l'utilisation de ce kit doivent être appliquées.

5. PROCEDURE

5.1. Préparation de la Biotine

Préparer une quantité suffisante de solution biotine-IA2 en reconstituant un flacon de biotine lyophilisée avec X ml de diluant pour la biotine-IA2 juste avant l'usage. La valeur de X est reportée sur la feuille de contrôle. Cette solution doit être utilisée dans la journée.

5.2. Préparation de la Solution de lavage

Préparer une quantité suffisante de solution de lavage en diluant la solution de lavage concentrée 1+9 avec de l'eau distillée ou déionisée. Par exemple, diluer 50 ml de la solution concentrée avec 450 ml d'eau distillée. La solution ne doit pas présenter de cristaux avant la dilution ; dissoudre éventuellement les cristaux en chauffant au max à 37 °C. La solution diluée peut être conservée entre 2 et 8 °C jusqu'à 30 jours.

5.3. Préparation de la streptavidine peroxydase

Préparer une quantité suffisante de solution de Streptavidine-peroxydase en diluant le concentré de streptavidine-perox 1+19 (0,25 ml strept concentrée avec 4,75 ml diluant pour strept-perox). La solution préparée est stable jusqu'à 4 semaines à 2 - 8 °C.

5.4. Procédure

Le kit contient une microplaque avec 8x12 puits recouverts d'antigène IA2 purifié. Le nombre de barrettes utilisées dans chaque essai dépend du nombre d'échantillons à analyser. Si on utilise les 12 barrettes, ce test permet d'analyser un total de 40 échantillons de sérum dupliqué.

NOTE IMPORTANTE: Porter tous les réactifs, y compris les sérums, à température ambiante (18-25°C) avant l'analyse.

Enlever le mélange de réaction, laver en ajoutant dans chaque puit 0,3 mL de solution de lavage diluée; répéter le lavage deux fois en éliminant complètement la solution.			
Biotine	100 µL	100 µL	
Sceller la microplaque avec la pellicule de plastique et incubé pendant 1 heure à température ambiante (18 - 25°C) en agitant à > 500 rpm. Enlever le mélange de réaction, laver en ajoutant dans chaque puit 0,3 mL de solution de lavage diluée; répéter le lavage deux fois en éliminant complètement la solution.			
Strept perox	100 µL	100 µL	
Sceller la microplaque avec la pellicule de plastique et incubé pendant 20 minutes à température ambiante (18 - 25°C) en agitant > 500 rpm. Eloigner le mélange de réaction, laver en ajoutant dans chaque puit 0,3 mL de solution de lavage diluée; répéter le lavage deux fois en éliminant complètement la solution.			
Substrat	100 µL	100 µL	100 µL
Recouvrir la microplaque et laisser incubé 20 minutes dans l'obscurité à température ambiante (18 - 25°C).			
Solution d'arrêt	100 µL	100 µL	100 µL
Agiter la microplaque pendant 5 secondes à >200 tpm. Lire l'absorbance (E) à 450 nm en mettant à zéro avec le Blanc dans les 5 min après l'ajout de la solution d'arrêt.			

La procédure de lavage est cruciale. Un lavage insuffisant entraîne une précision faible et une DO faussement élevée. Sans agitation, la DO mesurée sera 20% plus basse avec une perte de sensibilité.

6. RESULTATS

6.1. Courbe standard

La courbe standard est établie en traçant les valeurs moyennes des DO des standard 1-4 sur l'axe des ordonnées (axe y) contre les concentrations respectives des Ac IA2 sur l'axe des abscisses (axe x). Il est de plus recommandé d'utiliser le contrôle négatif (voir ci-dessous).

La concentration des anticorps IA2, des contrôles et des échantillons inconnus est lue directement en IU/ml en reportant la valeur de la DO à 450 nm sur la courbe standard. Le kit anti-IA2 peut aussi être utilisé avec Computer Assisted Analysis en utilisant un logiciel capable de tracer des courbes avec spline smoothing fit.

Exemple:

Echantillon	DO (a) 450 nm	DO (b) 450 nm	DO (moyenn e)	IU / ml
Contrôle Nég	0.076	0.078	0.077	1
Standard 1	0.226	0.230	0.228	15
Standard 2	0.633	0.662	0.648	60
Standard 3	2.672	2.835	2.754	200
Standard 4	3.462	3.744	3.693	400
Contrôle Pos	---	---	---	---
Patient 1	0.517	0.547	0.532	43.6

Réactifs	Standard	Echantillons	Blanc
Echantillons		50 µL	
Standard /Contrôles	50 µL		
Enhancer	25 µL	25 µL	
Couvrir la microplaque avec une pellicule de plastique et agiter à >500 tpm pendant 5 secondes; incubé entre 2 - 8°C jusqu'au lendemain (au moins 16 heures). Mettre la microplaque à température ambiante (18 - 25°C).			

6.2. Valeurs de référence

anti-IA2	
négatif	< 8.0 IU/ml
Zone grise	8.0 – 10.0 IU/ml
positif	≥ 10.0 IU/ml

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres plages de références normales et pathologiques pour les niveaux d'anticorps anti-IA2 dans le sérum. Donc, les valeurs reportées ci-dessus doivent être considérées uniquement comme indication.

7. CARACTERISTIQUES DE LA PROCEDURE

7.1. Calibration

Le kit anti-IA2 est calibré par rapport aux préparations de référence WHO NIBSC 97/550, les concentrations d'anticorps IA2 sont donc exprimées en IU/mL.

7.2. Linéarité

En considérant la nature hétérogène de la population des anticorps, leur spécificité et affinité, les valeurs théoriques attendues pour les dilutions des anticorps IA2, pourraient dans certains cas ne pas correspondre à la concentration mesurée au cours d'un test de récupération.

7.3. Spécificité et Sensibilité

En utilisant un cut-off de 10 IU/ml, le kit anti-IA2 a une sensibilité de 75 % et une spécificité de 98 %, chez les patients avec développement récent de diabète de type 1.

7.4. Limites de détection

La sensibilité analytique (plus faible concentration détectable, 0 ± 3 DS) est établie à 0,5 IU/ml.

La sensibilité fonctionnelle est mesurée comme 20 % du CV inter-tests à 0,8 IU/ml.

7.5. Variation Intra et inter-tests

Intra-test			Inter-tests		
Echant. n°	Concentration Moyenne (IU/ml)	CV (%)	Echant. n°	Concentration Moyenne (IU/ml)	CV (%)
1	24	4	5	1	6
2	48	4	6	14	7
3	118	2	7	136	9
4	259	5	8	182	8

8. DISPOSITIONS POUR L'ELIMINATION

Les réactifs doivent être éliminés en accord avec les lois locales.

BIBLIOGRAPHIE

- 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.Hatziagelaki & 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; clinival 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

SUGGESTIONS POUR LA RESOLUTION DES PROBLEMES /TROUBLESHOOTING

ERREURS CAUSES POSSIBLES/SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'échantillon

- absence distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution de l'échantillon (ex. Distribution accidentelle des réactifs en séquence erronée ou provenant de flacons erronés, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basses)

- conjugué non adéquat (ex. ne provenant pas du kit original)
- temps d'incubation trop bref, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop hautes)

- conjugué non adéquat (ex. ne provenant pas du kit original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (faible degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non complètement enlevé)

Valeurs inexplicables hors échelle

- contamination de pipette, embouts ou récipients- lavages insuffisants (conjugué pas complètement enlevé)
- CV% intra-test élevé

- réactifs et/ou strip non portés à température ambiante avant l'utilisation

- le laveur pour microplaques ne lave pas correctement (suggestion: nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-test élevé

- conditions d'incubation non constantes (durée ou température)

- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler la séquence de distribution)

- variabilité intrinsèque des opérateurs

DE*Verwendete Symbole***EL***Επεξήγηση συμβόλων***EN***Explanation of symbols***ES***Explicación de los símbolos***FR***Explication des symboles***IT***Spiegazione dei simboli***PT***Significado dos símbolos*

	DE In-vitro-Diagnostikum EL In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή EN In vitro diagnostic medical device ES Para diagnóstico in vitro FR Dispositif médical de diagnostic in vitro IT Dispositivo di diagnostica in vitro PT Dispositivos médicos para diagnóstico in vitro		DE Hergestellt von EL Κατασκευαστής EN Manufacturer ES Fabricado por FR Fabriqué par IT Fabbrikante PT Produzido por
REF	DE Bestellnummer EL Αριθμός καταλόγου EN Catalogue number ES Número de catálogo FR Références du catalogue IT Numero di catalogo PT Número do catálogo	 yyyy-mm	DE Herstellungsdatum EL Ημερομηνία κατασκευής EN Date of manufacture ES Fecha de producción FR Date de fabrication IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis (letzter Tag des Monats) EL Χρήση έως (η τελευταία ημέρα του μήνα) EN Use by (last day of the month) ES Fecha de caducidad (usar antes del último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar até (antes do último dia do mês)		DE Biogefährdung EL Βιολογικός κίνδυνος EN Biological risk ES Riesgo biológico FR Risque biologique IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten EL Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης EN Read instructions for use ES Consultar las instrucciones de uso FR Consulter le mode d'emploi IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung EL Αριθμός παρτίδας EN Batch code ES Código de lote FR Numéro de lot IT Codice del lotto PT Lote
 Σ = xx	DE Ausreichend für "n" Tests EL Το περιεχόμενο επαρκεί για "n" δοκιμασίες EN Contents for "n" tests ES Contenido suficiente para "n" ensayos FR Contenu suffisant pour "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Conteúdo suficiente para "n" testes		DE Inhalt EL Περιεχόμενο του κιτ EN Contents of kit ES Contenido del kit FR Contenu du coffret IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich EL Όρια θερμοκρασίας EN Temperature interval ES Temperatura de conservación FR Limites de température de conservation IT Limiti di temperatura PT Intervalo de temperatura		

**Manufacturer:****DiaMetra S.r.l. Headquarter:**

Via Garibaldi, 18
20090 SEGRATE (MI)
Tel. 0039-02-2139184 - 02-26921595
Fax 0039-02-2133354.

Manufacturing site:

Via Giustozzi 35/35a
Z.I Paciana
06034 FOLIGNO (PG) ITALY.
Tel. 0039-0762-24864
Fax 0039-0762-316197
E-mail: info@diametra.com

**UK
UNITED KINGDOM**

Distributed by
A. Menarini Diagnostics Ltd
405 Wharfedale Road
Winnersh - Wokingham
Berkshire RG41 5RA

**DE
DEUTSCHLAND**

Vertrieb durch
A. Menarini Diagnostics
Eine Division der
Berlin-Chemie AG
Glienicke Weg 125
12489 Berlin

**EL
Διανέμεται στην**

ΕΛΛΑΔΑ από την
A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argypourpolis
Attiki

**ES
ESPAÑA**

Distribuido por
A. Menarini Diagnostics S.A.
Avenida del Maresme,120
08918 Badalona
Barcelona

**FR
FRANCE**

Distribué par
A. Menarini Diagnostics
France S.A.R.L.
3-5, Rue du Jura
BP 70511
94633 Rungis Cedex

**IT
ITALIA**

Distribuito da
A. Menarini Diagnostics
Via Lungo l'Enza, 7
50012 Bagno a Ripoli
Firenze

**PT
PORTUGAL**

Distribuido por
A. Menarini Diagnósticos, Lda
Quinta da Fonte
Edifício D.Manuel I, 2ºB
2770-203 Paço de Arcos