

RSR LIMITED

AVENUE PARK
PENTWYN
CARDIFF
CF 23 8HE

UNITED KINGDOM

Revisão: 04/12/2006

AUTO-ANTICORPO IA-2 RIE - RSR

FINALIDADE

O ensaio RSR IA-2Ab RIE deve ser usado apenas por profissionais e é destinado a determinação quantitativa de auto-anticorpos IA-2 (IA-2Ab) em soro humano.

Auto-anticorpos contra antígenos de células beta pancreáticas são marcadores sorológicos importantes para *diabetes melitus* tipo 1. Os antígenos reconhecidos por estes anticorpos incluem insulina, ácido glutâmico descarboxilase (GAD₆₅ kDa isoforma) e IA-2 (ou ICA512).

REFERÊNCIAS

M.Masuda et al
"Autoantibodies to IA-2 in IDDM. Measurement with a new immunoprecipitation assay"
Clin Chimica Acta 2000;291; 53 – 66

PRINCÍPIO DO ENSAIO

No radioimunoensaio (RIE) RSR IA-2 Ab, auto-anticorpos IA-2 presentes nos soros dos pacientes, calibradores e controles interagem com IA-2 marcado com I¹²⁵. Após incubação overnight, uma proteína A de fase sólida é então adicionada a fim de precipitar o complexo marcado IA-2 – IA-2 Ab. Após mais uma incubação de 1 hora, é adicionado tampão em todos os tubos e estes são então centrifugados. Qualquer I¹²⁵ não ligado é removido por aspiração dos sobrenadantes. Os precipitados resultantes, são então contados em contador gama e a % de ligação é determinada.

O nível de radioatividade nos precipitados é proporcional a quantidade de anticorpos IA-2 presentes nas amostras.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O soro a ser analisado deve ser ensaiado logo após a separação ou deve ser armazenado, de preferência em aliquotas, a -20°C ou temperatura inferior. 40µL são suficientes para 1 ensaio (determinações em duplicata). Devem ser evitados repetidos ciclos de congelamento ou aumentos na temperatura de armazenamento.

Armazenamento incorreto das amostras de soro pode levar a perda de atividade do anticorpo. Não utilize amostras lipêmicas ou hemolisadas.

Plasma pode ser utilizado desde que seja coletado com EDTA. Quando necessário descongele as amostras a temperatura ambiente e homogeneíze suavemente a fim de assegurar a homogeneidade. Centrifugue as amostra antes do uso (de preferência por 5 minutos a 10-15.000 g em microcentrífuga) para a remoção de qualquer partícula em suspensão. Por favor, não omita esta etapa se a amostra estiver turva ou apresentar partículas.

REAGENTES FORNECIDOS NOS KITS DE 50 E 100 TUBOS

MATERIAL	50 TUBOS	100 TUBOS
I ¹²⁵ IA-2	1 x 2.6 mL	2 x 2.6 mL
Calibradores	5 x 0.15 mL	5 x 0.15 mL
Controles	2 x 0.15 mL	2 x 0.15 mL
Proteína A	1 x 2.6 mL	2 x 2.6 mL
Tampão de Ensaio	1 x 120 mL	1 x 120 mL

MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Tubos plásticos de 3 mL
- Pipetas com capacidade para dispensar 20 µL, 50 µL, 1mL e 2.6 mL
- Centrífuga refrigerada com capacidade para 1500 xg.
- Contador Gama.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

A	IA-2 marcado com I¹²⁵ Liofilizado	50 kBq/frasco (na fabricação)
	Reconstituir cada frasco com 2.6 mL de tampão de ensaio (D) e homogeneizar suavemente até dissolução. Uma vez reconstituído, armazenar de 2-8°C por até 2 semanas.	
B1-5	Calibradores 0, 0.75, 2, 10, 50 u/mL Pronto para uso	
	Unidades são: unidades arbitrárias RSR; análise do NIBSC 97/550 no ensaio para anticorpo IA-2 RSR indicou que 1 unidade RSR por mL é equivlente a 125 unidades por mL do 97/550.	
C1-2	Controles Positivos (veja a etiqueta para o intervalo das concentrações) Pronto para uso	
D	Tampão de Ensaio Pronto para uso. Armazenar de 2-8°C	
E	Proteína A liofilizada	
	Reconstituir cada frasco com 2.6 mL de tampão de ensaio (D) e homogeneizar em vórtex para dissolução. Homogeneizar completamente antes do uso no ensaio a fim de assegurar a suspensão uniforme. Após reconstituição, armazenar de 2-8°C e utilizar dentro de 2 semanas.	

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Deixe todos os reagentes, exceto o Tampão de Ensaio, ficar à temperatura ambiente (20-25°C) por, pelo menos, 30 minutos antes do início do ensaio.

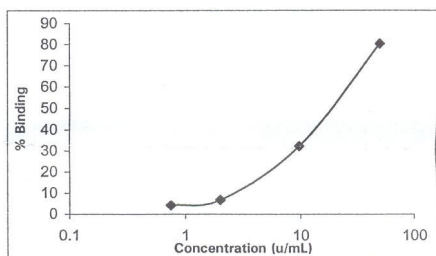
1. Pipete 20µL das amostras, calibradores (B1-5) e controles (C1-2) de ensaio aos tubos plásticos (apropriadamente identificados e colocados em estante adequada) em duplicata.
2. Pipete 50µL de IA-2-I¹²⁵ (A) a cada tubo e em dois tubos vazios para as contagens Totais.
3. Homogeneize os tubos (excluindo os tubos de contagem total) em vórtex e cubra-os adequadamente.
4. Incube "overnight" por 16 – 20 horas de 2-8°C.
5. Após incubação, pipetar 50µL de proteína A (E) em cada tubo (exceto nos tubos de contagem total).
6. Repita a etapa 3.
7. Incube de 2-8°C por 1 hora.
8. Após incubação, pipete 1 mL de tampão de ensaio (D) **gelado** em cada tubo (excluindo os dois tubos de contagens totais) e centrifugue cada tubo a 1500 xg por 30 minutos a 4°C.
9. Após centrifugação, aspire o sobrenadante e conte cada tubo por 1 minuto em contador gama.

RESULTADOS DA ANÁLISE

Uma curva de calibração pode ser estabelecida plotando-se a concentração do calibrador no eixo-x (escala log) contra a % de ligação dos calibradores no eixo-y (escala linear). As concentrações dos auto-anticorpos IA-2 nas amostras de soro dos pacientes podem ser lidas na curva de calibração. Outros sistemas de redução de dados podem ser utilizados.

RESULTADOS TÍPICOS (somente como exemplo; não utilize para os cálculos de resultados atuais).

CALIBRADOR u/mL	% de IA-2 I ¹²⁵ ligado	Concentração (u/mL)
Contagem Total	46.168	
0	2.4	
0.75	4.2	
2	6.8	
10	32.3	
50	80.4	
Controle 1	12.1	3.5
Controle 2	57.7	24.2



foi obtido de animais saudáveis e proteínas bovinas foram fornecidas por países livres de BSE, porém este material deve ser manuseado como potencialmente infeccioso. Alguns componentes contêm pequenas quantidades de azida sódica (< 0.1%) como conservante. Evite a formação de azidas metálicas pesadas no sistema de encanamento deixando correr grande quantidade de água, quando desprezar qualquer componente do kit. Cada laboratório deve estabelecer seus próprios limites de normalidade e patológico para IA-2 Ab. Os dados apresentados nesta bula devem servir apenas como guia. É recomendado que cada laboratório inclua seu próprio painel de amostras controle no ensaio juntamente com os controles fornecidos no kit.

Revisão – assessoria: 26/01/2007

Biom. Resp.: Dra. Adriana Beatriz C. Almeida – CRBM: 3828

Registro do Produto M.S.: 10337680036

CONSERVAR ENTRE +2 E + 8°C

Importado e distribuído por:

Genese Produtos Diagnósticos Ltda.

Autorização de Funcionamento M.S.:103376-8

Rua Diogo Vaz , 291 – CAMBUCI

CNPJ. 68.384.155/0001-02

CEP. 01527-020 - São Paulo - SP

Fabricado por:

RSR Ltd., Avenue Park, Pentwyn, Cardiff CF23

8HE, UK. Tel.+44-29-2073-2076 Fax +44-29-2073-2704

e-mail info@rsrtd.com

Atendimento ao consumidor - Fone (0xx)(11)-3341.6987

CUT OFF DO ENSAIO

Cut Off	u/L
Negativo	≤ 1.0 u/mL
Positivo	> 1.0 u/mL

VALIDAÇÃO CLÍNICA

Especificidade e Sensibilidade Clínica

113 indivíduos, doadores de sangue saudáveis, foram ensaiados com o kit RIE IA-2Ab. 99% foram identificados como negativos para auto-anticorpos IA-2.

Amostras de 217 pacientes diagnosticados com diabetes tipo 1 foram ensaiadas com o kit RIE IA-2 Ab. 47% foram identificados como positivos para auto-anticorpos IA-2. No estudo DASP para o kit RSR IA-2 RIE, foi demonstrado especificidade de 100% (n=100) e sensibilidade de 70% (n=50).

Limite Mínimo de Detecção

O calibrador mais baixo foi ensaiado 20 vezes e a média e desvio padrão foi calculado. O limite mínimo de detecção com + 2 desvios padrões foi de 0.19 u/mL.

Precisão Inter-Ensaio

Amostra	u/mL (n=25)	CV %
1	6.1	3.3
2	15.0	5.3

Precisão Intra-Ensaio

Amostra	u/mL (n=25)	CV %
1	6.4	2.5
2	15.1	2.8

Exatidão Clínica

Em um estudo de IA-2Ab em diferentes grupos de pacientes utilizando-se o kit RSR IA-2Ab, IA-2Ab não foi detectado em pacientes com tireoidite de Hashimoto, miastenia gravis ou em pacientes positivos para dsDNAAb. 2.5% (n=40) dos pacientes com doença de Graves deram resultados positivos para IA-2 Ab.

Interferentes

Nenhum interferente foi observado quando as amostras foram inoculadas com os seguintes materiais: hemoglobina até 0.5 mg/mL ou intralípidos até 3000 mg/dL.

Os dados fornecidos nesta instrução de uso devem ser utilizados apenas como uma referência. É recomendado que cada laboratório inclua seus próprios painéis de amostras controle a cada ensaio. Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de normalidade e patológicos para níveis de IA-2 Ab.

CONSIDERAÇÕES SOBRE SEGURANÇA

Este kit é destinado ao uso diagnóstico *in vitro* e deve ser manipulado por profissionais somente. Siga as instruções com cuidado e observe as datas de validade impressas nos rótulos. Este kit contém material radioativo. Observar a legislação local e nacional e códigos governamentais para utilização, armazenamento, transporte e descarte de materiais radioativos. Evite contato com a pele e roupas. Materiais radioativos devem ser utilizados somente por pessoas autorizadas em áreas designadas. Limpe imediatamente qualquer respingo e descontamine a área devidamente. Lave as mãos após o manuseio. Materiais de origem humana usados na preparação do kit foram testados e não se apresentaram reativos para anticorpos HIV 1 e 2 , HCV e HbsAg porém devem ser manuseados como potencialmente infeccioso. Evite a ingestão, inalação, injeção e contato com pele, olhos e roupas. Lave muito bem as mãos se uma contaminação ocorrer. Esterilize todo o lixo potencialmente contaminado, incluindo amostras de teste antes de descartá-las. Material de origem animal usado na preparação do kit