



# **anti-GAD<sub>65</sub> RIA**

***KIPM2070***

***KIPM2071***



# History

---

## Summary of change :

<b>Previous Version :</b> 180921/2	<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> "
/	Addition of Manufacturer symbol
PI number	PI number cleared

Read entire protocol before use.

## anti-GAD<sub>65</sub> RIA

### I. INTENDED USE

Radioligand assay for the determination of autoantibodies to Glutamic Acid Decarboxylase (GAD<sub>65</sub>Ab) in human serum.

### II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource anti-GAD<sub>65</sub> RIA Kit
- B. **Catalog number :** KIPM2070: 100 tests  
KIPM2071: 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 in all ages.

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 (IA2).

GAD, the enzyme that catalyzes the conversion of glutamate to GABA, has been identified in two isoforms, molecular weight 65.000 (GAD65) and 67.000 (GAD67). Although GAD autoantibodies are found in type 1 diabetes and in the rare neurological disorder Stiff man syndrome (SMS), the GAD autoantibodies profile in the two diseases differs. Auto-antibodies of SMS patients recognize predominantly linear epitopes on the N-terminus of the GAD protein. The use of a truncated antigen in the anti-GAD65 is limiting the use of this assay for the detection of neurological antibodies.

GAD65 autoantibodies are present in 70-80 % of newly diagnosed patients with type 1 diabetes and can be detected many years before clinical onset of the disease. The combination of the autoantibodies to GAD65 and IA2 is highly relevant for risk assessment of type 1 diabetes in children and adolescence. These tests in combination are more sensitive and predictive than ICA in risk groups, e.g. relatives of type 1 diabetes.

GAD65 autoantibodies also occur in a subset of adults with type 2 diabetes (non-insulin-dependent diabetes mellitus). These patients can have pronounced hyperglycemia, and after therapy with oral hypoglycemic agents for several months to years they may become insulin dependent. Therefore, these patients are thought to have a slowly progressive form of type 1 diabetes, sometimes called latent diabetes or latent autoimmune diabetes in adults (LADA). The presence of GAD65 autoantibodies in sera of such patients is a sensitive and specific marker for future insulin dependency.

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIASource anti-GAD<sub>65</sub> RIA kit is a direct assay based on the principle of radioligand assays. Highly purified human recombinant GAD<sub>65</sub> is labeled with <sup>125</sup>Iodine. This tracer is used in excess and bound by the GAD<sub>65</sub> autoantibodies of the sample.

The DIASource anti-GAD<sub>65</sub> RIA 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 GAD<sub>65</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 GAD<sub>65</sub> autoantibodies (anti-GAD<sub>65</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 GAD<sub>65</sub> are absent in the sample, as the tracer binds solely to GAD<sub>65</sub> autoantibodies, but not to Protein A.

A standard curve with a range of 0.1 - 120 U/ml is established by measuring cpm respectively the binding B/T % of the calibrators 1 - 6. The anti-GAD<sub>65</sub> concentration value of the patient's sample is directly read off against this curve.

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	50 Tests Kit	100 Tests Kit	Reconstitution		
<table border="1"> <tr> <td>Ag</td> <td>125I</td> </tr> </table> <p>TRACER: <sup>125</sup>Iodine labelled GAD<sub>65</sub> (human, recombinant)</p>	Ag	125I	1 vial Lyo <0.05 MBq	2 vials Lyo <0.05 MBq/vial	<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 6 Anti-GAD<sub>65</sub> calibrators in human serum (conc: see vial label)</p>	CAL	N	6 vials 0.25ml	6 vials 0.25ml	<b>Ready for use</b>
CAL	N				
<table border="1"> <tr> <td>PROTEIN A</td> </tr> </table> <p>Protein A component</p>	PROTEIN A	1 vial Lyo	2 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	1 vial 12 ml	<b>Ready for use</b>
REC	SOLN				
<table border="1"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Controls - N = 1 or 2 Anti- GAD<sub>65</sub> controls in human serum (conc: see vial label)</p>	CONTROL	N	2 vials 0.25ml	2 vials 0.25ml	<b>Ready for use</b>
CONTROL	N				
<table border="1"> <tr> <td>PREC</td> <td>AGENT</td> </tr> </table> <p>Precipitation buffer</p>	PREC	AGENT	1 vial 55 ml	1 vial 110 ml	<b>Ready for use</b>
PREC	AGENT				

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

- Precision pipettes 20 - 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 samples to reach room temperature prior to assay. Take care to agitate serum samples gently in order to ensure homogeneity.

##### 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 1 - 6:** Ready for use.

**Control serum 1-2:** Ready for use.

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

The DIASource anti-GAD<sub>65</sub> RIA kit has been designed for 100 and 50 determinations, respectively. This is sufficient for the analysis of 41 or 16 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, that of the complete kit on the box label.

Upon receipt, all components of the DIASource anti-GAD<sub>65</sub> RIA kit have to be kept at 2 - 8 °C, preferably in the original kit box.

#### IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Blood is taken by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation. 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 of conical tubes for the DIASource anti-GAD<sub>65</sub> kit only.**

1. Label test tubes appropriately.
2. Pipette into the corresponding tubes according to assay scheme
  - 20 µl calibrators,
  - 20 µl control sera,
  - 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 T.  
*Tubes T are now separated until radioactivity is measured.*
4. Incubate for 2 hours (at room temperature).
5. Add 50 µl Protein A solution (prepared from Protein A component and reconstitution buffer), each.  
(Agitate the suspension gently prior to use - please cf. section VII. Reagent preparation before use).
6. Incubate for 1 hour (at room temperature).
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 T**.  
Recommended counting time: 1 minute

#### XI. CALCULATION OF RESULTS

The standard curve is established by plotting the mean cpm values or preferentially the respective binding rates B related to the total radioactivity T (B/T %) of the calibrators 1 - 6 on the ordinate, y-axis, versus their respective anti-GAD<sub>65</sub>-concentrations on the abscissa, x-axis.

It is recommended to use both axes in logarithmic scale.

The anti-GAD<sub>65</sub> concentrations of the controls and the unknown samples are directly read off in U/ml against the respective cpm or B/T values.

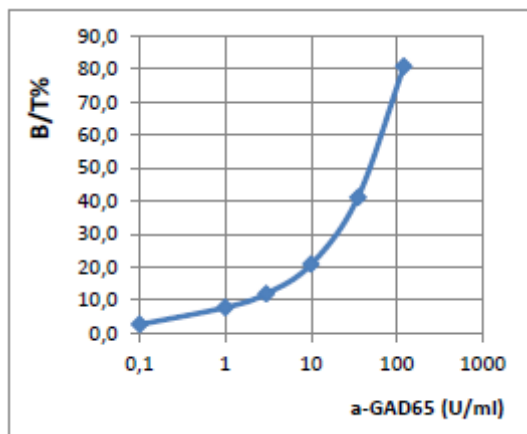
DIAsource anti-GAD<sub>65</sub> M may be used also with Computer Assisted Analysis using software with spline smoothing calculation, such as for sandwich-type assays (IRMA).

## XII. TYPICAL DATA

**Do not use for evaluation!**

Test tubes	cpm (mean)	$\frac{B}{T}$ %	U/ml
Total radioactivity T	31977	100	---
Calibrator 1	742	2.3	<b>0.1</b>
Calibrator 2	2464	7.7	<b>1</b>
Calibrator 3	3838	12.0	<b>3</b>
Calibrator 4	6683	20.9	<b>10</b>
Calibrator 5	13172	41.2	<b>35</b>
Calibrator 6	25901	80.8	<b>120</b>
Control serum	---	---	---
Patient 1	10077	31.5	<b>20.7</b>

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 the DIAsource anti- GAD<sub>65</sub> RIA kit, this value is found at approx. 0.7 U/ml.

Anti-GAD<sub>65</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-GAD<sub>65</sub> concentrations above approx. 0.7 U/ml, however, fulfill these criteria and are consequently assessed as valid.

### B. Specificity

The DIAsource anti-GAD<sub>65</sub> RIA kit using <sup>125</sup>Iodine labelled GAD<sub>65</sub> has showing 100% specificity and 100% sensitivity when comparing with an established reference assay.

The high quality of the tracer (<sup>125</sup>I-GAD<sub>65</sub>) ensures the exclusive reaction of anti-GAD<sub>65</sub> autoantibodies in direct assay principle. Any detectable cross reaction with autoantibodies to thyroglobulin, thyroidal peroxidase, to the TSH receptor, to IAA and to IA2 does not exist.

### C. Calibration

The units in the DIAsource anti-GAD<sub>65</sub> RIA kit are arbitrary units.

### D. Parallelism of standards and serum samples

Dilutions of specimen in anti-GAD<sub>65</sub> free human serum are determined according to their expected theoretical values with the DIAsource anti-GAD<sub>65</sub> RIA kit. In some cases the expected theoretical values are not determined due to the heterogeneous nature of the autoantibody population in human serum and in view of epitope specificity and affinity of the autoantibodies.

Sample Nr.	Intraassay (n=20)		Interassay (n=5 x 10)	
	Mean (U/ml)	CV (%)	Mean (U/ml)	CV (%)
1	0.8	10.0	0.6	20.7
2	8.2	6.8	8.4	5.2
3	45.9	1.3	45.6	1.1

### E. Limitations

Healthy individuals should be tested negative by using the DIAsource anti-GAD<sub>65</sub> RIA kit.

However, GAD<sub>65</sub> autoantibodies may be also present in a rare neurological disorder, Stiff-man Syndrome (SMS). GAD autoantibodies from patients with SMS are directed mainly to linear epitopes of GAD<sub>65</sub> and GAD<sub>67</sub>, whereas type 1 diabetes antibodies recognize only conformational epitopes of GAD<sub>65</sub>. In SMS, the antibodies titers are found much higher. For further quantification such sera could be diluted with factor 1:50 and 1:100 with GAD<sub>65</sub> autoantibody negative sera.

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-GAD <sub>65</sub>	
GAD <sub>65</sub> antibodies negative	< 1.0 U/ml
GAD <sub>65</sub> antibodies Greyzone	≥ 1.0 – < 2.0 U/ml
GAD <sub>65</sub> antibodies positive	≥ 2.0 U/ml

Normal range was established by Receiver Operating Characteristics (ROC) analysis.

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges for serum anti-GAD<sub>65</sub> antibodies levels as usually done for other diagnostic parameters, too. Therefore, the above mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

## 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*	Cal	Ctrl	Pat.-Sera 1, 2 etc.	T
2	Pipette Cal 1 - 6 Ctrl 1 - 2 Patient sera	20 µl	20 µl	20 µl	
3	Pipette Reconstituted Tracer	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
4	Incubate**	2 hours (at room temperature)			
5	Pipette Reconstituted Protein A component	50 µl	50 µl	50 µl	
6	Incubate**	1 hours (at room temperature)			
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 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 : KIPM2070/KIPM2071	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/>**

# DIASource anti-GAD65 RIA

## 1. 제품개요

순번	항목	내용
1	품목명	자가면역질환검사시약
2	제품명	DIASource anti-GAD65 RIA
3	허가번호	수인 18-4412 호
4	사용목적	사람의 혈청 내 글루타민산 디카복실라제 (GAD65Ab)의 자가항체를 방사성리간드 측정법으로 정량측정하여 1형 당뇨병 진단에 도움을 주는 체외 진단용 의약품
5	포장단위	50/100 테스트/키트
6	저장방법	별첨
7	사용기한	별첨

## 2. 측정원리

DIASource anti-GAD65 RIA 키트는 방사성리간드 검사 원리를 기초로 하는 직접 측정법이다. 고도로 정제된 인간 재조합형 GAD65는 125I로 표시되어 있다. 이 트래이서는 과도하게 사용되며, 검체의 GAD 65 자가항체와 결합된다.

DIASource anti-GAD65 트래이서는 높은 순도, 효소가 갖는 기능성, 빠른 반응, '0' 레벨의 교차반응과 안정성에 있어 많은 조건을 갖추고 있다. 이것들은 트래이서의 특정한 결합과 검체의 GAD65 자가항체 인식에 있어 중요한 전제조건이다. 자가항체의 Fc 영역에 결합되고 용해된 단백질 A를 첨가함으로써, 샌드위치 타입의 복합체가 형성된다. 완충액을 첨가함으로써 면역 복합체는 원심 분리를 통해 결합된 (B)의 단순한 분리를 촉진하는 고체 단계로 축발될 것이다. 기울어 따르는 방법이나 흡입법으로 결합되지 않은 트래이서를 제거한 후, 남은 침전물의 방사능이 측정된다. 검체속 GAD65 자가항체의 농도는 트래이서의 결합양에 반영된다. 결합양의 방사성 신호는 자가항체 농도에 비례한다. 트래이서는 단백질 A 가 아닌 GAD65 자가항체와만 결합하기 때문에 검체에 GAD65 자가항체가 없으면 면역 복합체는 형성되지 않는다. 0.1-120 U/ml 내에 있는 표준곡선은 칼리브레이터 1-6번의 B/T% 결합 cpm을 각각 측정함으로써 그려진다. 환자 검체의 anti-GAD65 농도 값은 곡선에 바로 읽혀진다. Anti-GAD의 측정은 유형

- 1) IDDM: 인슐린의존성 당뇨병)과 유형
- 2) NIDDM: 비인슐린 의존성 당뇨병) 당뇨 환자의 예측, 진단과 치료에 중요하다..

## 3. 제공되는 시약

번호	명칭	구성		비고
		50 Test Kit	100 Test Kit	
1	Tracer( <sup>125</sup> I labelled GAD <sub>65</sub> )	1 vial	2 vial	
2	Protein A	1 vial	2 vial	
3	Calibrator 1-6	6 vial, 0.25ml	6vial,0.25ml	
4	Control I, II	2 vial	2 vials,0.25ml	
5	Reconstitution Buffer	1 vial,6ml	1 vial, 12ml	
6	Precipitation Buffer	1 vial,55ml	1 vial, 110ml	

## 4. 측정절차

### 1) 검체 준비 및 시약의 준비

#### (1) 검체

- ① 혈액은 정맥채혈로 채집된다. 응고가 일어난 후, 혈청은 원심분리법으로 분리된다. 지방 혈성, 용혈성 검체는 사용하지 안 된다.
- ② 검체는 2-8°C에서 3일까지 보관 할 수 있고, 장기간 보관을 위해서는 -20°C에서 보관 해야 한다.
- ③ 반복된 냉동과 해동은 피해야한다. 여러번의 사용을 위해서는 사전에 검체를 분할하고 -20°C에서 보관한다.

#### (2) 시약

- 모든 시약은 실온에서 준비한다. 균질화를 위해 혈청 검체를 조심스럽게 저어준다.
- ① 트래이서: 바이알마다 2.6ml의 재구성용액으로 재구성한다. 재구성된 시약은 2-8°C 에서 보관될 시 2주 동안 안전하다.
  - ② 재구성 용액: 바로 사용되어지도록 준비되어있고, 트래이서와 단백질 A의 재구성에 쓰인다.
  - ③ 침전액: 침전액은 바로 사용되어지도록 준비되어있고, 방사성 면역물질의 세척과 침전을 위해 사용된다. 차갑게 사용하도록 한다.
  - ④ 단백질 A: 바이알마다 2.6ml의 재구성 용액으로 재구성한다. 재구성된 시약은 2-8°C 에서 보관되면 2주 동안 안전하다.

⑤ 표준용액 1-6 : 바로 사용되어지도록 준비되어 있다.

⑥ 정도관리용액 1-2 : 바로 사용되어지도록 준비되어 있다.

## 2) 저장방법

DIASource Anti GAD 키트는 각각 100개와 50개 검사를 위해 설계되어있다. 이것은 41개 또는 16개의 알려지지 않은 검체와 표준용액, 정도관리용액 검사에 충분한 양이다. 각 구성품의 유효기간은 개별 라벨에 쓰여 있으며, 완제품 키트 상자에 쓰여져 있다. 키트를 받고 나서는 DIASource AntiGAD의 모든 구성품이 2-8°C 에 보관되어야 하고, 가급적이면 원래 키트상자에 보관되어져야 한다.

## 3) 검사과정

- (1) 시험관을 알맞게 표시한다.
- (2) 검사 과정에 따라 알맞은 시험관에 분주한다.
  - 20 $\mu$ l 표준용액, 20 $\mu$ l 정도관리 용액, 20 $\mu$ l 환자의 검체 등
- (3) 재구성된 트래이서 50 $\mu$ l를 모든 시험관에 첨가한다.
- (4) 2시간동안 (실온에) 배양시킨다.
- (5) 재구성된 단백질 A 용액 50 $\mu$ l를 첨가한다.
- (6) (실온에) 1시간 동안 배양시킨다.
- (7) 1ml의 차가운 침전액을 각 시험관에 첨가한다.
- (8) 2000 x g의 속도로 4-8°C에서 30분 동안 원심 분리시킨다.
- (9) 표면에 뜨는 물질을 완전히 흡출하거나 붓는다. 남아있는 용액을 없애기 위하여, 시험관을 거꾸로 뒤집고(2-3분 동안) 휴지에 조심스럽게 털어내어 물기를 흡수 시킨다.
- (10) T를 포함한 모든 시험관의 방사능을 측정한다. 권장 계수 시간: 1분

## 4) 결과 산출

표준곡선은 y축에 표준용액 1-6의 평균 cpm 값을, x축에 각 anti-GAD 농도를 작도함으로써 결정된다. 정도관리 물질과 검체의 Anti-GAD 농도는 각 cpm 값의 U/ml 로 읽혀진다. 총 방사능량 T에 관련된 결합 속도 B 또한 표준곡선 (B/T%) 를 설정하는데 사용되어 질 수 있다. DIASource Anti-GAD는 샌드위치 검사 방법 (IRMA) 같이 컴퓨터 지원 분석을 이용한 소프트웨어와 사용되어 질 수 있다.

## 5)참고치

anti-GAD <sub>65</sub>	
GAD <sub>65</sub> antibodies negative	< 1.0 U/mL
GAD <sub>65</sub> antibodies Greyzone	1.0 - 2.0 U/mL
GAD <sub>65</sub> antibodies positive	≥ 2.0 U/mL

정상범위는 Receiver Operating Characteristics(ROC) 분석에 의해 설정되었다.

## 5. 완제품 시험규격

### 1) 외관검사

제조원의 품질관리표준지침서(문서번호 POCQ075)에 따라 시험한다.

- (1) 포장된 키트내의 총수량이 맞는지 확인한다.
- (2) 키트내의 구성품이 맞는지 확인한다.
- (3) 제품 구성표의 lot와 구성품의 lot가 일치하는지 확인한다.
- (4) 구성품과 키트의 유효기간을 확인한다.
- (5) 구성품의 라벨상태를 확인한다.
- (6) 구성품의 포장상태를 확인한다. (용량, 용기, 물질등)
- (7) 사용설명서가 맞게 포함되어있는지 확인한다.
- (8) 박스에 라벨이 정확하게 부착 되어있는지 확인한다.
- (9) 검사 후 담당자는 확인양식(FTPQ004)에 기입하고 서명한다.

### 2) 성능시험

제조원의 품질관리 표준지침서(문서번호 POCQ006)에 따라 시험한다.

- (1) 총 계수는 허용범위 (35,000-48,000 cpm) 내에 있어야 한다.
- (2) 표준물질 0의 결합율은 허용범위(1.4-3.1%)<sup>1)</sup>내에 있어야 한다.
- (3) 표준물질 1의 결합율은 허용범위(3.0-8.0%)<sup>1)</sup>내에 있어야 한다.
- (4) 표준물질 6의 결합율은 허용범위 (70-80%)<sup>1)</sup> 내에 있어야 한다.
- (5) 키트에 정도관리물질에서 얻어진 값이 허용범위 내에 있어야 한다.
  - Control I : 2.5-4.5 U/ml
  - Control II : 18-32 U/ml
- (6) 표준물질은 허용범위내에 있어야 한다.
  - Calibrator 1 : 0.07-0.13 U/ml
  - Calibrator 2 : 0.7-1.3 U/ml
  - Calibrator 3 : 2.5-4.5 U/ml
  - Calibrator 4 : 8.5-15.5 U/ml
  - Calibrator 5 : 28-52 U/ml
  - Calibrator 6 : 80.150 U/ml



# DIAsource anti-GAD65 RIA

비고 : 각 로트의 허용범위는 방사면역측정을 위한 표준지침서  
(문서번호. CACQKIPM 2070)에 기록되어 있다.

## 6. 사용시 주의사항

### 1) 일반적인 주의사항

- (1) 체외 진단용으로만 사용한다.
- (2) 이 kit는 이온화  $\chi$ (27keV)와  $\gamma$ (35keV)의 방사선을 방출하는 <sup>125</sup>I (반감기: 59일)를 포함한다.
- (3) 사용지시를 조심히 따른다. 이 사용설명서는 현재키트와 구성요소들에 한해서만 유효하다. 구성품 중 하나라도 바뀔 경우 CE 규제에 어긋난다.
- (4) 각 라벨에 적혀져 있는 유효기간은 관찰되어야한다. 재구성 시약들의 유효성 또한 마찬가지이다.
- (5) 모든 시약은 사용되기 전 운송 컨테이너에서 2-8°C에 보관 되어져야 한다.

### 2) 방사선 안전에 대한 기본 규칙

- (1) 방사성 물질을 다루는 업무 공간에서 흡연, 음주, 식사를 하지 않는다.
- (2) 항상 보호 안경을 착용한다.
- (3) 절대 방사성 물질을 입으로 분주 하지 않는다.
- (4) 액체가 쏟아졌을 경우, 재빨리 닦고 해당 표면을 제염제로 꼼꼼히 씻는다.
- (5) 오염된 휴지, 시험관, 벤치 덮개, 장갑 등을 특별히 표시된 상자에 놓는다. 액체나 고체로 된 방사성 폐기 물질을 주정부, 연방정부, 지역 관계자나 규제에서 허락된 데로만 버린다.
- (6) 이 제품의 사용자는 방사성 물질을 다룰 때 국법이나 지역 관계자의 지시대로 따를 책임 이 있다.
- (7) 이 제품을 사용할 때 어떠한 경우에도 모든 일반적 비임상 시험 기준과 개인적인 규제가 적용된다.

### 3) 아지드화 나트륨

몇몇의 시약들은 보존제로 소량의(<0.1%) 아지드화 나트륨을 가지고 있다. 아지드화 나트륨은 삼키거나 피부, 점막에 닿으면 절대로 안된다. 배수 할 때 중금속과 가능한 결합을 막기 위하여 물로 충분히 씻어낸다.

### 4) 사람의 혈청

이 kit에 포함된 인간의 혈액성분은 간염과 에이즈에 대해 음성을 나타냈다. 그러나 이러한 방법이 인간의 혈액파생물에 의한 간염, 에이즈, 또는 기타 감염을 전염시키지 않는다는 것을 보장할 수는 없다. 따라서, 시약과 검체의 취급시에는 잠재 위험물질로 취급한다.

### 5) 사용 조건

- (1) 사용하기 전 검체는 실온에 둔다.
- (2) 균질성을 확보하기 위해 혈청검체는 조심스럽게 저어준다.
- (3) 시험은 duplicates로 한다.
- (4) 각 구성품의 유효기간은 각각의 라벨에 기재되어 있다.
- (5) 수령 시 DIAsource anti-GAD<sub>65</sub> RIA kit의 모든 구성요소는 2-8°C로 유지 해야 하며, 가급적 원래 kit 상자 안에 보관해야 한다.
- (6) 혈액은 정맥채혈 하고, 응고가 일어난 후 혈청은 원심분리법으로 분리된다.
- (7) 지방혈성, 용혈성 검체는 사용해서는 안 된다.
- (8) 검체는 2-8°C에서 3일까지 보관할 수 있고, 장기간 보관은 -20°C에서 보관한다.
- (9) 냉.해동의 반복을 피한다.
- (10) 검체를 여러번 사용하기 위해서는 처음에 검체를 분할하고 -20°C에서 보관한다.

별첨 : 저장방법 및 사용기한

anti-GAD RIA구성시약	개봉여부	보관조건	사용기간 (제조일로부터)	비고
Total Kit	미개봉	2-8 °C	8주	완제품
Tracer				
Protein A				
Calibrator 1~6				
Control I, II				
Reconstitution Buffer				
Precipitation Buffer				
Precipitation Buffer				

anti-GAD RIA구성시약	개봉여부	보관조건	사용기간 (제조일로부터)	비고
Total Kit	개봉 및 재구성	2-8 °C	2주	완제품
Tracer	재구성			
Protein A	개봉			
Calibrator 1~6				
Control I, II				
Reconstitution Buffer				
Precipitation Buffer				
Precipitation Buffer				

Lire la totalité du protocole avant utilisation.

## anti-GAD<sub>65</sub> RIA

### I. UTILISATION PRÉVUE

Test par radioligand pour le dosage des autoanticorps anti-acide glutamique décarboxylase (GAD<sub>65</sub>Ac) dans le sérum humain.

### II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. **Nom de spécialité :** Trousse de dosage radio-immunologique DIAsource anti-GAD<sub>65</sub>
- B. **Numéro de référence :** KIPM2070 : 100 tests  
KIPM2071 : 50 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
2, Rue du Bosquet, 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-dépendant, 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, à tous les âges.

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 est 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 (IA2).

Le GAD, l'enzyme catalysant la conversion du glutamate en GABA, a été identifié sous deux isoformes de poids moléculaire 65,000 kDa (GAD<sub>65</sub>) et 67,000 kDa (GAD<sub>67</sub>). Bien que les autoanticorps anti-GAD soient retrouvés dans le diabète de type 1 et dans un syndrome neurologique rare, le syndrome de l'homme raide, le profil des autoanticorps anti-GAD est différent dans les deux maladies.

Les autoanticorps des patients atteints du syndrome de l'homme raide reconnaissent de façon prédominante les épitopes linéaires, au niveau de la région N-terminale de la protéine GAD. L'usage d'un antigène tronqué dans le kit anti-GAD<sub>65</sub> en limite l'utilisation pour la détection d'anticorps neurologiques uniquement.

Les autoanticorps anti-GAD<sub>65</sub> sont retrouvés chez 70 % à 80 % des patients atteints de diabète de type 1 nouvellement diagnostiqué et ils peuvent être détectés de nombreuses années avant le début clinique de la maladie.

La combinaison aux autoanticorps anti-GAD<sub>65</sub> et anti-IA2 est très pertinente pour l'évaluation du risque de diabète de type 1 chez les enfants et adolescents. L'association de ces tests est plus sensible et prédictive que l'ICA dans les groupes à risque, par exemples les membres de la famille d'un patient atteint de diabète de type 1.

Les autoanticorps anti-GAD<sub>65</sub> apparaissent également dans un sous-groupe d'adultes ayant un diabète de type 2 (diabète non-insulino-dépendant). Ces patients peuvent avoir une hyperglycémie marquée et devenir insulino-dépendants après plusieurs mois ou années de traitement avec des médicaments hypoglycémiant par voie orale. On estime, par conséquent, que ces patients présentent une forme lentement évolutive de diabète de type 1, parfois appelé diabète latent ou diabète auto-immun latent de l'adulte (LADA).

La présence d'anticorps anti-GAD<sub>65</sub> dans le sérum de tels patients est un marqueur sensible et spécifique d'une dépendance future à l'insuline.

#### IV. PRINCIPES DE LA MÉTHODE

La trousse de dosage radio-immunologique DIAsource anti-GAD<sub>65</sub> est un test direct reposant sur le principe des tests à radioligands. Du GAD<sub>65</sub> humain recombiné hautement purifié est marqué avec de l'<sup>125</sup>Iode. Ce marqueur est utilisé en excès et lié aux autoanticorps anti-GAD<sub>65</sub> de l'échantillon.

Le marqueur de l'immunodosage DIAsource anti-GAD<sub>65</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-GAD<sub>65</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-GAD<sub>65</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 GAD<sub>65</sub> dans l'échantillon puisque le marqueur ne se fixe qu'aux autoanticorps anti-GAD<sub>65</sub> et pas à la Protéine A.

Une courbe de référence ayant une plage comprise entre 0,1 et 120 U/ml est établie en mesurant les cpm, et les pourcentages de liaisons B/T respectifs des étalons 1 à 6. La valeur de la concentration des autoanticorps anti-GAD<sub>65</sub> est lue directement par comparaison avec cette courbe.

#### V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	Trousse de 50 tests	Trousse de 100 tests	Reconstitution
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">Ag</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">125I</div> MARQUEUR : GAD <sub>65</sub> marqué à l'iode <sup>125</sup> (humain, recombinant)	1 flacon Lyo < 0,05 MBq	2 flacons Lyo < 0,05 MBq/flacon	Reconstituer avec 2,6 ml de tampon de reconstitution
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CAL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">N</div> Étalons - N = 1 à 6 Étalons anti-GAD <sub>65</sub> dans du sérum humain (conc. : voir l'étiquette du flacon)	6 flacons 0,25 ml	6 flacons 0,25 ml	Prêts à l'emploi
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">PROTÉINE A</div> Composant de la Protéine A	1 flacon Lyo	2 flacons Lyo	Reconstituer avec 2,6 ml de tampon de reconstitution
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">REC</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">SOLN</div> Tampon de reconstitution	1 flacon 6 ml	1 flacon 12 ml	Prêt à l'emploi
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CONTRÔLE</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">N</div> Contrôles - N = 1 ou 2 Contrôles anti-GAD <sub>65</sub> dans du sérum humain (conc. : voir l'étiquette du flacon)	2 flacons 0,25ml	2 flacons 0,25ml	Prêts à l'emploi
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">AGENT</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">PRÉC.</div> Tampon de précipitation	1 flacon 55 ml	1 flacon 110 ml	Prêt à l'emploi

#### VI. MATÉRIEL NON FOURNI

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

- Compteur γ

#### VII. PRÉPARATION DU RÉACTIF

Laisser les échantillons revenir à température ambiante avant de procéder au test. Veiller à agiter délicatement les échantillons de sérum pour assurer leur homogénéité.

##### 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 1 à 6 : Prêts à l'emploi.

Sérum de contrôle 1 et 2 : Prêts à l'emploi.

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

La trousse de dosage radio-immunologique DIAsource anti-GAD<sub>65</sub> a été conçue pour permettre respectivement 50 et 100 mesures. Cela est suffisant pour l'analyse de 41 ou 16 échantillons inconnus ainsi que pour les étalons et sérums de contrôle testés en double.

La date d'expiration de chaque élément est indiquée sur son étiquette propre, celle de la trousse complète sur l'étiquette de la boîte.

À réception, tous les composants de la trousse de dosage radio-immunologique DIAsource anti-GAD<sub>65</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. 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

**Utilisation de tubes conique pour la trousse de dosage radio-immunologique DIAsource anti-GAD<sub>65</sub> uniquement.**

1. Étiqueter les tubes à essais correctement.
2. Pipetter dans les tubes correspondants selon le plan du test
  - 20 µl d'étalons,
  - 20 µl de sérums de contrôle,
  - 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 **T**.  
*Les tubes T sont maintenant séparés jusqu'à la mesure de la radioactivité.*
4. Incuber pendant 2 heures (à température ambiante).
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 la suspension avant utilisation - veuillez consulter la section VII. Préparation du réactif avant utilisation).
6. Incuber pendant 1 heure (à température ambiante).
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 y compris les tubes T**.  
Durée de mesure recommandée : 1 minute

## XI. CALCUL DES RÉSULTATS

La courbe de référence est établie en marquant les valeurs moyennes de cpm ou - de préférence - les taux de fixation B respectifs par rapport avec la radioactivité totale (% B/T) des étalons 1 à 6 sur l'axe des ordonnées (axe y) par rapport aux concentrations respectives d'anti-GAD<sub>65</sub> - concentrations sur l'axe des abscisses (axe x).

On recommande d'utiliser les deux axes dans l'échelle logarithmique. Les concentrations d'anticorps anti-GAD<sub>65</sub> des contrôles et des échantillons inconnus sont lues directement en U/ml contre les valeurs respectives de cpm ou B/T.

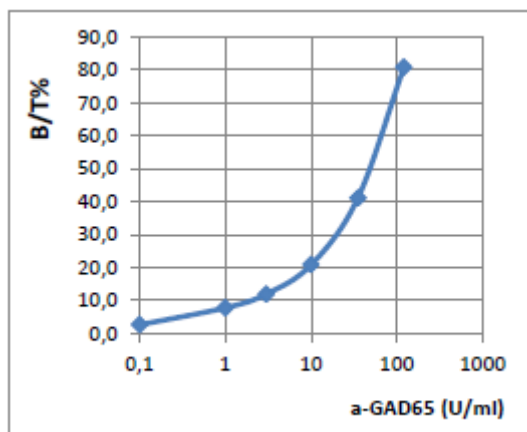
DIASource anti-GAD<sub>65</sub> peut aussi être utilisée avec une analyse assistée par ordinateur utilisant un logiciel avec calcul de lissage de courbe, comme pour les tests de type sandwich (IRMA).

## XII. DONNÉES TYPES

**Ne pas utiliser pour une évaluation !**

Test tubes	cpm (mean)	$\frac{B}{T}$ %	U/ml
Total radioactivity T	31977	100	---
Calibrator 1	742	2.3	<b>0.1</b>
Calibrator 2	2464	7.7	<b>1</b>
Calibrator 3	3838	12.0	<b>3</b>
Calibrator 4	6683	20.9	<b>10</b>
Calibrator 5	13172	41.2	<b>35</b>
Calibrator 6	25901	80.8	<b>120</b>
Control serum	---	---	---
Patient 1	10077	31.5	<b>20.7</b>

Courbe de référence type :



## XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

### A. Limite de détection

La définition la plus appropriée et la plus statistiquement raisonnable de la limite inférieure de détection d'un 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 de dosage radio-immunologique DIASource anti-GAD<sub>65</sub> est correctement utilisée pour une performance maximum, cette valeur est d'approximativement 0,7 U/ml.

Les valeurs des anticorps anti-GAD<sub>65</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-GAD<sub>65</sub> supérieures à 0,7 U/ml, approximativement, répondent en revanche à ces critères et sont par conséquent jugées valides.

### B. Spécificité

La trousse de dosage radio-immunologique DIASource anti-GAD<sub>65</sub> utilisant du GAD<sub>65</sub> marqué à l'<sup>125</sup>Iode a démontré une spécificité de 100 % et une sensibilité de 100 % comparativement au test de référence reconnu.

La haute qualité du marqueur (<sup>125</sup>I-GAD<sub>65</sub>) garantit une réaction exclusive des autoanticorps anti-GAD<sub>65</sub> dans le principe de test direct. Il n'existe pas de réactivité croisée détectable avec des autoanticorps dirigés contre la thyroglobuline, la peroxydase thyroïdienne, le récepteur du TSH, IAA et IA2.

### C. Étalonnage

Les unités utilisées pour la trousse de dosage radio-immunologique DIASource anti-GAD<sub>65</sub> sont des unités arbitraires.

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

Les dilutions des échantillons de sérum humain sans anticorps anti-GAD<sub>65</sub> sont déterminées selon leurs valeurs théoriques attendues avec la trousse de dosage radio-immunologique DIASource anti-GAD<sub>65</sub>. Dans certains cas, les valeurs théoriques attendues ne sont pas déterminées en raison de la nature hétérogène de la population d'autoanticorps dans le sérum humain et dans l'optique de la spécificité de l'épitope et de l'affinité des autoanticorps.

Échantillon	Intra-test (n = 20)		Inter tests (n = 5 x 10)	
	Moyenne (U/ml)	CV (%)	Moyenne (U/ml)	CV (%)
1	0,8	10,0	0,6	20,7
2	8,2	6,8	8,4	5,2
3	45,9	1,3	45,6	1,1

### E. Limites

Chez des sujets en bonne santé, le test effectué au moyen de la trousse de dosage radio-immunologique DIASource anti-GAD<sub>65</sub> devrait être négatif.

Toutefois, des autoanticorps anti-GAD<sub>65</sub> peuvent aussi être présents dans un syndrome neurologique rare, le syndrome de l'homme raide. Les autoanticorps GAD des patients souffrant du syndrome de l'homme raide sont principalement dirigés contre les épitopes linéaires GAD<sub>65</sub> et GAD<sub>67</sub>. Alors que ceux des patients souffrant de diabète de type I reconnaissent uniquement les épitopes conformationnelles de GAD<sub>65</sub>. Les autoanticorps retrouvés dans le sérum de patients atteints du syndrome de l'homme raide ont des titres supérieurs à ceux retrouvés chez les patients atteints de diabète de type 1. Pour des quantifications supplémentaires, le sérum peut être dilué avec un facteur 1:50 et 1:100 avec du sérum négatif au GAD<sub>65</sub>.

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-GAD <sub>65</sub>	
anticorps anti-GAD <sub>65</sub> négatifs	< 1,0 U/ml
Zone grise des anticorps anti-GAD <sub>65</sub>	≥ 1,0 - < 2,0 U/ml
anticorps anti-GAD <sub>65</sub> positifs	≥ 2,0 U/ml

La plage normale a été établie par analyse Receiver Operating Characteristics (ROC).

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre plage de références normales et pathologiques pour les taux d'anticorps sériques anti-GAD<sub>65</sub> 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.

#### XV. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

##### Sécurité

Pour diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de <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 paillasse, 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 matériel 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*	Cal/Étalon	Ctrl/contrôle	Sérums de patients 1, 2, etc.	T
2	Pipette Étal. 1 à 6 Ctrl 1 à 2 Sérum de patient	20 µl	20 µl	20 µl	
3	Pipette Marqueur reconstitué	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
4	Incuber**	2 heures (à température ambiante)			
5	Pipette Composant de la Protéine A reconstitué	50 µl	50 µl	50 µl	
6	Incuber**	1 heure (à température ambiante)			
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 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 : KIPM2070/KIPM2071	Num. révision : 200224/1
---	-----------------------------

Date de révision : 2020-02-24



es

Leer todo el protocolo antes de utilizar.

## anti-GAD<sub>65</sub> RIA

### I. USO PREVISTO

Ensayo de Radioligando para la determinación de auto-anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65) en suero humano.

### II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre registrado:** DIAsource anti-GAD<sub>65</sub> RIA Kit
- B. **Número de catálogo:** KIPM2070: 100 pruebas  
KIPM2071: 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 autoinmune 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>).

La GAD (enzima que cataliza la conversión del glutamato a GABA (ácido gamma-aminobutírico), ha sido identificada en dos iso-formas, con pesos moleculares de 65.000 (GAD<sub>65</sub>) y 67.000 (GAD67). Aunque los auto-anticuerpos GAD se presentan en la diabetes tipo 1 y en el poco frecuente síndrome neurológico de "persona rígida" (SPR), el perfil de estos anticuerpos es diferente en estas dos enfermedades. Los anticuerpos en pacientes con SPR reconocen predominantemente epítomos lineares y conformacionales en el extremo N-terminal de la proteína GAD. El uso de un antígeno truncado en pacientes con diabetes tipo 1 se dirige predominantemente a los epítomos conformacionales. El anti-GAD65 está limitando al uso de este ensayo para la detección de anticuerpos neurológicos.

Auto-anticuerpos anti-GAD<sub>65</sub> (Ac. GAD<sub>65</sub>) se observan en un 70-80 % de pacientes con diagnóstico reciente de diabetes tipo 1.

La combinación de pruebas para auto-anticuerpos anti-GAD<sub>65</sub> y anti-IA<sub>2</sub> tiene alta relevancia 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 I, teniendo así el potencial para reemplazar la técnica de ICA.

GAD65 también se han encontrado en un subgrupo de pacientes con diabetes tipo 2 (diabetes mellitus no insulino dependiente). Estos pacientes pueden mostrar una pronunciada hiperglicemia, que luego de una prolongada terapia (meses a años) con agentes hipoglicémicos orales pueden llegar a ser dependientes de insulina. Sin embargo, se cree que estos pacientes tienen una forma de diabetes de progresión más lenta que la diabetes tipo 1, a menudo llamada **diabetes autoinmune latente del adulto (LADA)** de sus siglas en inglés).

La presencia de anti-GAD<sub>65</sub> anticuerpos en el suero de tales pacientes es un marcador sensitivo y específico de una futura dependencia de insulina.

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

DIASource anti-GAD<sub>65</sub> es un ensayo directo basado en el principio de los ensayos de radioligando. Se utiliza como trazador GAD65 recombinante humano marcado con el yodo radiactivo I<sup>125</sup>. Este trazador se utiliza en exceso y se une a los autoanticuerpos anti-GAD65 de la muestra.

El trazador DIASource anti-GAD<sub>65</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-GAD<sub>65</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 GAD<sub>65</sub> (anti-GAD<sub>65</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 GAD<sub>65</sub> están ausentes, no tiene lugar la formación del inmunocomplejo, ya que el trazador se une únicamente a los autoanticuerpos anti-GAD<sub>65</sub>, pero no a la Proteína A.

Se establece una curva estándar entre 0,1 y 120 U/ml, por la medición de la relación B/T % de los calibradores 1 - 6. En esta curva se extrapola directamente el valor de la concentración de anti-GAD<sub>65</sub> de las muestras de los pacientes.

#### V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	50 pruebas Kit	100 pruebas Kit	Reconstitución		
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>Ag</td> <td>I<sup>125</sup></td> </tr> </table> <p>Trazador : <sup>125</sup>I GAD<sub>65</sub> (recombinante humano)</p>	Ag	I <sup>125</sup>	1 vial Lio <0.05 MBq	2 viales Lio <0.05 MBq/vial	Reconstituir con 2,6 ml de Tampón de reconstitución
Ag	I <sup>125</sup>				
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Calibradores - N = 1 to 6 Anti-GAD<sub>65</sub> calibradores en suero humano (conc: ver hoja adjunta)</p>	CAL	N	6 viales 0.25ml	6 viales 0.25ml	Listo para usar
CAL	N				
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>PROTEIN A</td> </tr> </table> <p>Componente con Proteína A</p>	PROTEIN A	1 vial Lio	2 viales Lio	Reconstituir con 2,6 ml de Tampón de reconstitución	
PROTEIN A					
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> <p>Tampón de reconstitución</p>	REC	SOLN	1 vial 6 ml	1 vial 12 ml	Listo para usar
REC	SOLN				
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Controles - N = 1 or 2 Anti-GAD<sub>65</sub> controls en suero humano (conc: ver hoja adjunta)</p>	CONTROL	N	2 viales 0.25ml	2 viales 0.25ml	Listo para usar
CONTROL	N				
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>PREC</td> <td>AGENT</td> </tr> </table> <p>Tampón de precipitación</p>	PREC	AGENT	1 vial 55 ml	1 vial 110 ml	Listo 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

Todas las pruebas deben alcanzar la temperatura ambiente antes de su utilización. Agitar cuidadosamente las pruebas para asegurar su homogeneidad.

#### 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!**

#### Componente con Proteína A:

Reconstituir con 2,6 ml de tampón de reconstitución. 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-GAD65 entre 2 - 8 °C.

**Calibradores 1 - 6:** Listo para usar.

**Controles 1-2:** Listo para usar.

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

El kit DIASource anti-GAD65 se ha diseñado para 100 y 50 determinaciones. Esta presentación es suficiente para el análisis de 41 o 16 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-GAD65 entre 2 - 8 °C, preferentemente en su envase original.

#### IX. 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. 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

El utilizo de tubos cónicos es recomendado.

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 asignados 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 por 2 horas a temperatura ambiente
5. Añadir 50 µl de la solución de proteína A (preparada a partir de Componente con 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 1 hora a temperatura ambiente
7. Añadir 1 ml 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 (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 contaje 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 - 6 en las ordenadas, eje-y, frente a sus concentraciones respectivas de anti GAD65 en las abscisas, eje-x.

Se recomienda para ambos ejes el uso de una escala logarítmica.

Las concentraciones de anti-GAD65 de los controles y de las muestras desconocidas se extrapolan directamente en U/ml a partir de sus valores respectivos en cpm o valores de B/T.

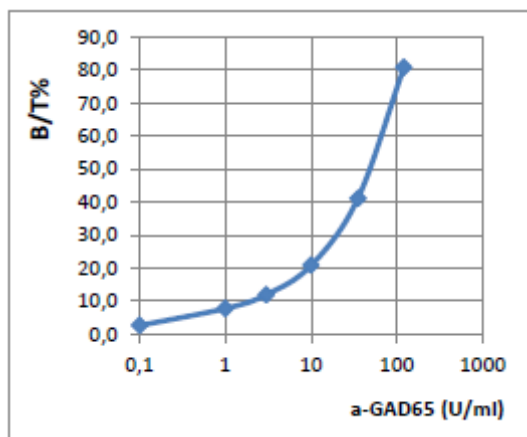
El ensayo DIASource anti-GAD<sub>65</sub> puede también utilizarse con un software capaz de diseñar una interpolación spline como ocurre con los ensayos tipo sándwich (IRMA).

## XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

**¡No utilizar para la evaluación!**

Test tubes	cpm (mean)	$\frac{B}{T}$ %	U/ml
Total radioactivity T	31977	100	---
Calibrator 1	742	2.3	<b>0.1</b>
Calibrator 2	2464	7.7	<b>1</b>
Calibrator 3	3838	12.0	<b>3</b>
Calibrator 4	6683	20.9	<b>10</b>
Calibrator 5	13172	41.2	<b>35</b>
Calibrator 6	25901	80.8	<b>120</b>
Control serum	---	---	---
Patient 1	10077	31.5	<b>20.7</b>

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-GAD<sub>65</sub> correcto este valor se encuentra aproximadamente en 0,7 U/ml.

Valores de anti-GAD<sub>65</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-GAD<sub>65</sub> superiores a la concentración aproximada de 0,7 U/ml, sin embargo, cumplen con estos criterios y por lo tanto deben considerarse como válidas.

### B. Especificidad

La elevada calidad del trazador (125I-GAD65) asegura que en el ensayo únicamente reaccionan los autoanticuerpos anti-GAD65 y que no tiene lugar ninguna reacción cruzada con autoanticuerpos frente a anti-IA2, insulina, tiroglobulina, tiroperoxidasa y frente el receptor de la tirotrópica.

## C. Calibración

Las unidades en el kit DIASource anti-IA2 son unidades arbitrarias.

## D. Paralelismo entre los estándares y las muestras

Las diluciones de las muestras con suero humano, libre de anti-GAD<sub>65</sub>, se determinan de acuerdo con los valores teóricos esperados con el kit DIASource anti-GAD<sub>65</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.

Muestra	Intra-ensayo (n=20)		Inter-ensayo (n=5 x 10)	
	Media (U/ml)	CV (%)	Media (U/ml)	CV (%)
1	0,8	10,0	0,6	20,7
2	8,2	6,8	8,4	5,2
3	45,9	1,3	45,6	1,1

## E. Limitaciones

El resultado del ensayo DIASource anti-GAD<sub>65</sub>, en individuos sanos, debería ser negativo.

Sin embargo, los autoanticuerpos anti-GAD65 pueden estar presente en un desorden neurológico raro, síndrome de la persona rígida (SPR). Los autoanticuerpos GAD de pacientes con SPR se dirigen principalmente a epítipos lineales de GAD65 y GAD67, mientras que aquellos de los pacientes que sufren de diabetes tipo 1 reconocen únicamente los epítipos conformacionales de GAD65. En SPR, los niveles de estos anticuerpos se encuentran mucho más altos que aquellos de los pacientes que sufren de diabetes tipo 1. Para una cuantificación adicional, los sueros pueden diluirse en un factor 1:50 y 1: 100 con sueros de autoanticuerpos negativos GAD65.

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-GAD <sub>65</sub>	
Negativo para GAD <sub>65</sub> -Ac	< 1.0 U/ml
Incierto para GAD <sub>65</sub> -Ac	≥ 1.0 – < 2.0 U/ml
Positivo para GAD <sub>65</sub> -Ac	≥ 2.0 U/ml

Los rangos de normalidad se establecieron con el análisis de las características operativas del receptor (análisis ROC).

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

## XV. PRECAUTIONS AND WARNINGS

t<sub>1/2</sub> = 59 días, radiación X (27 keV) and radiación gamma (35 keV)

**Este kit es para uso in vitro únicamente.** Se deben seguir las instrucciones cuidadosamente. Este manual de instrucciones es válido solamente para el presente kit con la composición dada. Un cambio en cualquiera de los componentes individuales no es acorde con las regulaciones CE.

Las fechas de vencimiento indicadas en los respectivos rótulos deben ser respetadas. Del mismo modo, la estabilidad que se indique para los reactivos reconstituídos debe ser tenida también en cuenta.

Los reactivos deben ser todos almacenados antes el uso a 2 - 8 °C en el envase original.

Algunos de los reactivos contienen pequeñas cantidades (< 0,1 %) de azida sódica como conservantes. Se debe evitar salpicaduras y contacto con piel y mucosas. La posibilidad de formar azidas de metales pesados en las tuberías de desagüe debe ser prevenida con una ingente cantidad de agua.



Los materiales derivados de fluidos u órganos humanos usados en la elaboración de este kit han sido evaluados, y los resultados encontrados han sido negativos para Hepatitis y HIV, así como también para anticuerpos contra HCV. No obstante, ninguna prueba conocida garantiza la ausencia de tales agentes virales. Por lo tanto, es necesario manipular los componentes del kit, así como las muestras de los pacientes como potencialmente infecciosos.

Debido a que esta prueba contiene material radioactivo, deben tomarse las siguientes precauciones:

- No fumar, comer o beber mientras se maneja el material en ningún espacio concebido para el trabajo con material radioactivo,
- Usar siempre guantes protectores,
- Nunca pipetear material radioactivo con la boca,
- Secar las salpicaduras rápidamente, lavando la zona afectada con un descontaminante adecuado,
- Poner los tejidos contaminados, tubos, toallas, guantes etc. en contenedores especiales macados, desechar residuos radioactivos, líquidos y sólidos, solamente como permitido por las autoridades y regulaciones federales, estatales o locales.

Es responsabilidad del usuario del producto de manejar el material radiactivo de acuerdo con las normas nacionales establecidas por leyes u otros decretos de autoridades locales.

En todos los casos buenas prácticas de laboratorio (BPL) junto con todas las regulaciones generales e individuales deben ser aplicadas para el uso de esta prueba.

**XVI. RESUMEN DEL PROTOCOLO**

1	Rotular los tubos*	Cal	Ctrl	Pat.-Suero 1, 2 etc.	T
2	Pipetear Calibradores 1 - 6 Suero de control I - II Sueros de los pacientes	20 µl	20 µl	20 µl	
3	Pipetear Trazador reconstituido	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
4	Incubar**	2 horas (a temperature ambiente)			
5	Pipetear Proteína A reconstituido	50 µl	50 µl	50 µl	
6	Incubar **	1 hora (a temperature ambiente)			
7	Pipetear Tampón de precipitación frío	1 ml	1 ml	1 ml	
8	Centrifugar	30 minutos at 4-8°C at 2000 x g			
9	Decantar  Aspirar sobrenadante	Dejar escurrir los tubos invertidos sobre papel absorbente de 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 : KIPM2070/KIPM2071	Revision nr : 200224/1
---	---------------------------

Revision date : 2020-02-24