

Anti-GAD₆₅ ELISA

REF KAPM3507

Enzyme immunoassay for the determination of antibodies against Glutamic Acid Decarboxylase (GAD₆₅) in human serum



Medipan GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow OT Dahlewitz
Germany
Phone: +49 33708 4417 0
Fax: +49 33708 4417 25
www.medipan.de



DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2
1348 Louvain-la-Neuve
Belgium
Phone: +32 10 84 99 11
Fax: +32 10 84 99 90
www.diasource-diagnostics.com



1 Intended Purpose

The Anti-GAD₆₅ ELISA is a quantitative immunoassay for the determination of antibodies against Glutamic Acid Decarboxylase (GAD₆₅) in human serum.

The Anti-GAD₆₅ ELISA is intended as an aid in the diagnosis of diabetes mellitus type 1 in conjunction with other clinical and laboratory findings.

The immunoassay is designed for manual professional *in vitro* diagnostic use.

2 Diagnostic Relevance

Diabetes mellitus type 1 is a chronic autoimmune disease in which the insulin-producing beta cells of the islets of Langerhans in the pancreas are destroyed. The consequence of this destruction is a reduced insulin production, which results in high blood sugar levels as diabetes mellitus. Genetic predispositions and viral infections are considered risk factors, but the exact causes have not yet been fully clarified.

The destruction of the insulin-producing beta cells of the pancreas is based on the presence of islet cell antibodies (ICA), which are directed against different antigens of the pancreatic islet cells, such as glutamic acid decarboxylase (GAD₆₅), tyrosine phosphatase (insulinoma-associated antigen 2, IA2), the zinc transporter 8 (ZnT8) and against insulin. Islet cell antibodies (ICA) can be detected in 70 – 80 % of patients with diabetes mellitus. The different antibodies usually appear months to years before the occurrence of elevated blood sugar levels and are therefore also considered important prognostic markers to identify patients with an increased risk of developing diabetes mellitus type 1. The combined detection of antibodies against GAD₆₅, IA2, ZnT8 and insulin is considered an important method for diagnosing diabetes mellitus type 1 at the onset of the disease.

Glutamic acid decarboxylase (GAD) catalyzes the synthesis of the neurotransmitter GABA in the brain and in the beta cells. Two isoforms of the enzyme are known: GAD65 with a molecular weight of 65 kDa and GAD67 with 67 kDa, respectively. Antibodies directed against GAD65 are observed in the majority of patients with diabetes mellitus type 1 and in a large number of individuals in the prediabetic phase. In contrast, antibodies directed against both GAD isoforms are found in patients with the very rare neuromuscular Stiff-man syndrome.

3 Test Principle

The ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) is an immunoassay for the determination of specific antibodies. The strips of the microtiter plate are coated with test-specific antigens. If antibodies are present in the patient's sample, they bind to the antigens. A second biotinylated antigen binds the immobilized antibody. The assay utilizes the ability of antibodies to act bivalently with immobilized and soluble antigens. Streptavidin conjugated with the enzyme peroxidase detects the generated immune complex. A colorless substrate is converted into the colored product by the peroxidase. The signal intensity of the reaction product is proportional to the antibody activity in the sample. After stopping the signal intensity of the reaction product is measured photometrically.

4 Test Components

Component	Description
Microtiter plate A MP 1 piece	12 breakable microtiter strips (ready-to-use), 8 wells per strip, each well coated with recombinant human GAD ₆₅
Calibrator 0 – 5 CAL 6 x 1.0 mL	Colored dilutions of human serum (ready-to-use; contains ProClin 950) The antibody activities are indicated on the quality control certificate.
Positive control CII CONTROL + 1 x 1.0 mL	Colored dilution of human serum (ready-to-use; contains ProClin 950) The antibody activity is indicated on the quality control certificate.
Sample diluent C DIL 1 x 20 mL	Colored solution (ready-to-use; contains ProClin 950)
GAD₆₅-Biotin H START 1 x 0.2 mL	Concentrated start reagent biotinylated GAD ₆₅ (contains sodium azide)
Diluent for GAD₆₅-Biotin J BUF H 1 x 20 mL	Solution (ready-to-use; contains ProClin 950)
Streptavidin-peroxidase (SA-POD) D CONJ 1 x 0.2 mL	Concentrated streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (100x)
Diluent for SA-POD G BUF D 1 x 20 mL	Solution (ready-to-use; contains ProClin 950)
Wash buffer B WASHB 1 x 100 mL	Concentrated solution (10x; contains ProClin 950)
Substrate E SUB 1 x 15 mL	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (ready-to-use)
Stop solution F STOP 1 x 15 mL	0.25 M Sulfuric acid (ready-to-use)

Adhesive Foil 2 pieces	-
QC Certificate 1 piece	-
Instructions for Use 1 piece	-

5 Materials required but not provided

- Common laboratory equipment
- Precision pipettes (5 – 1000 µL), multi-channel pipettes (100 – 1000 µL) and disposable pipette tips
- Graduated cylinders (100 – 1000 mL)
- Vortex mixer or other rotators
- Microtiter plate shaker
- Microtiter plate washer or wash comb
- Microtiter plate reader with optical filters for 450 nm and 620 nm or 690 nm
- Adsorbent paper or paper towel
- Distilled or de-ionized water

6 Storage and Stability

Upon receipt, all test components must be stored at 2 °C to 8 °C, preferably in the original kit box. If stored properly in their original containers, all components are stable until their expiry date.

7 General Information

This product is for *in vitro* diagnostic use only. The instructions for use must be carefully read before use. They are valid only for the present product with the given composition and must be strictly followed to ensure reliable test results. Deviations can lead to erroneous test results. Components must not be exchanged by test reagents of different lots or of other manufacturers.

Contamination of reagents must be avoided by use of aseptic techniques when removing aliquots from the vials. After use, reagent vials must be tightly closed with their corresponding caps. Cross-contamination of samples or reagents can lead to inconsistent test results and must be avoided by use of consistent pipetting techniques.

Exposure of reagents to strong light must be avoided throughout the entire test procedure and storage.

Insufficient washing will result in poor precision and elevated measurement signals. After each washing step any residual fluid has to be removed completely.

8 Preparation

8.1 Preparation of Reagents

The microtiter plate and all reagents except the GAD65-Biotin Concentrate (H) must be brought to room temperature (RT: 18 °C to 25 °C) for at least 30 min before use. All liquid components must be mixed gently to ensure homogeneity.

8.1.1 Microtiter Plate

The microtiter plate is sealed in an aluminium bag. Unused test strips should always be stored refrigerated and protected from moisture with the desiccant in the properly sealed aluminum bag. Carefully resealed, the test strips can be used for 8 weeks after opening.

8.1.2 Calibrators

The calibrators are ready-to-use and must not be diluted any further. Calibrators must be used in each test run.

8.1.3 Controls

The positive control is ready-to-use and must not be diluted any further. Controls must be used in each test run. Laboratories can also validate their own control samples and use them alternatively.

8.1.4 GAD₆₅-Biotin (H) and Diluent (J)

A sufficient amount of GAD₆₅-Biotin solution must be prepared by diluting x mL GAD₆₅-Biotin (H) with y mL diluent for GAD₆₅-Biotin (J) directly before use. The concentrate must be stored at 2 °C to 8 °C until use. For exact dilution volumes x and y see certificate of analysis supplied with the kit. The dilution ratio for manual and automated processing can be different. The GAD₆₅-Biotin solution prepared is to be used within one day and must not be stored.

8.1.5 Streptavidin-peroxidase (D) and Diluent (G)

A sufficient amount of streptavidin-peroxidase solution must be prepared by diluting SA-POD concentrate (D) 1 + 99 (e. g. 0.1 mL SA-POD concentrate with 9.9 mL diluent for SA-POD (G). The SA-POD solution prepared is stable up to 4 weeks at 2 °C to 8 °C.

8.1.6 Wash Buffer

The wash buffer is concentrated and must be diluted 1:10 with distilled water before use (e. g. 100 mL + 900 mL). A sufficient amount of washing solution must be prepared. The diluted washing solution can be stored at 2 °C to 8 °C up to 30 days.

8.1.7 Substrate

The substrate is ready-to-use. Exposure of the substrate solution to strong light should be avoided.

8.1.8 Stop Solution

The stop solution is ready-to-use.

8.2 Preparation of Samples

8.2.1 Sample Material

The use of freshly collected serum from blood taken by venipuncture is recommended. The use of icteric, lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples should be avoided. Insoluble substances must be removed from the sample by centrifugation. Samples must not be thermally inactivated.

8.2.2 Sample Storage

Samples may be kept at 2 °C to 8 °C up to three days. Long-term storage requires -20 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided. For multiple use, samples should be aliquoted and kept at -20 °C.

9 Test Performance

9.1 Pipetting Scheme

The following pipetting scheme is recommended:

	1	2	3	4
A	CAL 0	Sample 2		
B	CAL 1	Sample 3		
C	CAL 2	Sample 4		
D	CAL 3	Sample 5		
E	CAL 4	...		
F	CAL 5	...		
G	CII	...		
H	Sample 1	...		

9.2 Procedure

The indicated incubation times and temperatures must be adhered to and significant time shifts during pipetting samples and reagents must be avoided. The microtiter plate should be shortly shaken after addition of reagents.

Step	Description
1. Addition of dilution buffer	Add 100 µL ready-to-use dilution buffer into the wells of patient samples; leave the wells of calibrators and controls empty.
2. Addition of calibrators,	Add 50 µL ready-to-use calibrators, controls and undiluted samples per well

controls and samples	
3. Incubation	Cover the plate and incubate for 60 min. at RT while shaking at > 500 rpm on a plate shaker
4. Preparation of reagents	Prepare sufficient volumes of reagents (B, D/G, H/J)
5. Wash cycle	Aspirate the solution and wash 3 times with 300 µL washing solution with at least 5 seconds soaking time each; dry by tapping the microtiter plate on a paper towel to remove any residual droplets
6. Addition of start reagent	Add 100 µL of diluted GAD ₆₅ -Biotin solution (prepared from H and J) to each well
7. Incubation	Cover the plate and incubate for 60 min. at RT while shaking at > 500 rpm on a plate shaker
8. Wash cycle	Aspirate the solution and wash 3 times with 300 µL washing solution with at least 5 seconds soaking time each; dry by tapping the microtiter plate on a paper towel to remove any residual droplets
9. Addition of conjugate	Add 100 µL of diluted SA-POD (prepared from D and G) to each well
10. Incubation	Cover the plate and incubate for 20 min. at RT while shaking at > 500 rpm on a plate shaker
11. Wash cycle	Aspirate the solution and wash 3 times with 300 µL washing solution with at least 5 seconds soaking time each; dry by tapping the microtiter plate on a paper towel to remove any residual droplets
12. Addition of substrate	Add 100 µL ready-to-use substrate to each well and shake the plate shortly
13. Incubation	Cover the plate and incubate for 20 min. in the dark at RT without shaking
14. Addition of Stop Solution	Add 100 µL ready-to-use stop solution to each well and shake the plate shortly
15. Analysis	Read optical density (OD) at 450 nm versus 620 or 690 nm within 30 min. after stopping the reaction

9.3 Automation

Automated processing of the immunoassays must be performed analogous to manual use and validated by the user.

10 Test Evaluation

10.1 Metrological Traceability

The immunoassay is calibrated using the international WHO reference preparation NIBSC code 97/550. Quantitative results are expressed in IU/mL.

10.2 Quantitative Evaluation

For generation of a standard curve, the optical signals (optical density, OD) of the calibrators are plotted against their antibody activities and correlated by a 4-parameter logistic (4 PL) fit. Antibody activities of unknown samples can be derived directly from their optical signals by use of the generated standard curve.

10.3 Criteria of Validity

Test runs are only valid if the following criteria of validity are fulfilled:

- OD CAL 0 < CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4 < CAL 5
- OD CAL 5 > 1.2
- The positive control must be evaluated positive and present an antibody activity within the validity range indicated on the quality control certificate.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

10.4 Troubleshooting

In case of an invalid test run, the expiry dates and storage conditions, incubation times and temperatures, and precise calibration of all instruments used should be verified. If no reason for an invalid test run could be identified, please contact the supplier or manufacturer of the product.

10.5 Reference Ranges

The reference ranges are indicated below:

	Interpretation
Antibody activity < 5 IU/mL	negative
Antibody activity ≥ 5 IU/mL	positive

As a result of different seroprevalences in individual regions, each laboratory should verify the reference ranges by own analysis and adapt, if necessary.

10.6 Interpretation of Test Results

A positive test result indicates the presence of specific antibodies. A negative result indicates the absence of specific antibodies, but does not exclude the possibility of an autoimmune reaction. In case of a borderline test result, a reliable evaluation is not possible.

10.7 Limitations of the Method

In the rare neurological disorder, Stiff-man Syndrome (SMS) round 60 % of patients have GAD₆₅ Abs in their serum. GAD₆₅ Abs from patients with SMS have much higher titers compared with those of patients with type 1 diabetes. For this reason sera from patients with suspicion of SMS should be prediluted 1:50 or 1:100 with GAD₆₅ Abs negative sera. GAD₆₅ Abs occur also in cerebrospinal fluid of patients with SMS

The interpretation of test results must always be considered in combination with the clinical picture of the patient. The diagnosis should not be based on the results of a sole diagnostic method. All clinical and laboratory findings should be evaluated to state a diagnosis. For confirmation, further investigations should be carried out.

11 Performance Characteristics

11.1 Analytical Performance Characteristics

11.1.1 Analytical Sensitivity and Specificity

The Limit of Blank (LoB) was determined by multiple analysis of sample diluent. The Limit of Quantitation (LoQ) was correlated to an interassay coefficient of variation of 20 %.

	Analytical Sensitivity
Limit of Blank (LoB)	< 0.5 IU/mL
Limit of Quantitation (LoQ)	< 1.0 IU/mL

11.1.2 Precision

The precision of test results was assessed by the determination of the intra- and interassay variation by the analysis of multiple samples with different antibody activities.

	Intraassay Precision		Interassay Precision	
	IU/mL	CV (%)	IU/mL	CV (%)
Sample 1	17	9,0	15	9.1
Sample 2	80	6.1	76	5.5

Sample 3	183	5.7	186	5.3
----------	-----	-----	-----	-----

11.1.3 Measurement Range

Reliable accuracy, trueness, precision, linearity and recovery of test results have been observed within the measurement range of the assay from the LoQ to the upper calibrator in comprehensive studies. Samples with test results above the upper calibrator should be reported as >max. Samples with test results below the LoQ should be reported as <min. If test results above the upper calibrator are observed, the samples may be tested at a higher dilution. The resulting antibody activity must be multiplied with the additional dilution factor.

11.2 Diagnostic Performance Characteristics

11.2.1 Diagnostic Sensitivity and Specificity

Sensitivity and specificity were assessed by the analysis of serum samples from 74 patients with diabetes mellitus type I and 57 samples from unselected blood donors.

	Diagnostic Performance
Sensitivity	90.5 %
Specificity	94.7 %

12 Warnings and Precautions

The product is designed exclusively for *in vitro* diagnostic use by qualified, authorized and trained personnel. All test components and human samples should be handled with care as potentially hazardous. Good laboratory practices (GLP) and all relevant regulations should be adhered to.

In case the product is damaged or product information including labelling is wrong or incorrect, please contact the manufacturer or supplier.

This product contains preparations of human and / or animal origin. Any material derived from human body fluids or organs used for the preparation of components were tested and found negative for HBsAg (Hepatitis B-Virus-surface Antigen) and anti-HIV as well as anti-HCV antibodies. However, all components and all patient samples should be handled as potentially hazardous in accordance with national laws and appropriate guidelines on biological safety.

As the product contains potentially hazardous materials, the following precautions should be followed: Do not smoke, eat or drink while handling kit material or samples. Avoid direct contact to kit material or samples by wearing protective gloves laboratory coat and safety glasses. Never pipette material by mouth. Wipe up spills promptly and wash the affected surface thoroughly with a decontaminant. Wash hands thoroughly after use.

Some of the reagents contain ProClin (< 1.0 %) as a preservative, may cause skin sensitization (H317) and must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucosa (P280, P333+P313).

Some of the reagents contain sodium azide (< 0.1 %) as a preservative and 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.

The information in the safety data sheet on possible hazards, first aid measures, measures in the event of the unintentional release of large quantities, handling and storage, personal protective equipment, information on disposal as well as information on toxicology must be observed.

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the member state in which the user and/or the patient is established.




























13 Disposal

For decontamination and disposal the recommendations of the CDC as well as the relevant local and national environmental guidelines and regulations should be adhered to. Samples, potentially contaminated materials and infectious waste must be decontaminated, e.g. by autoclaving for 20 min. at 121 °C.

14 References

- Batstra MR, Anstoot HJ, Herbrink P: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using β -cell autoantibodies. Clin. Lab. 2001, 47, 497 – 507.
- Seissler J, Hatzigelaki E, Scherbaum WA: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 2001, 109, Suppl 2, 304 – 16.
- Pozzilli P, Manfrini S, Monetini L: Biochemical markers of type 1 diabetes, clinical use. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 2001; 235, 38 – 44.
- Scherthamer G, Hink S, Kopp HP et al.: Progress in the characterization of slowly progressive autoimmune diabetes in adult patients (LADA or type 1.5 diabetes). Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. 2001, 109, Suppl 2, 94 – 108.
- Winter WE, Harris N, Schatz D: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. Clinical Diabetes 2002, 20, 183 – 91.

15 Symbols

	Manufacturer
	Distributor
	CE marking of conformity
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Catalogue number
	Unique device identifier
	Batch code
	Temperature limit
	Use-by date
	Consult instructions for use
	Contains sufficient for <n> tests
	Do not re-use
	Caution
	Warning
	Biological risk
	Keep away from sunlight
	Microtiter plate
	Calibrators
	Positive control
	Enhancer
	Start reagent
	Diluent for start reagent
	Conjugate
	Diluent for conjugate
	Wash buffer
	Substrate
	Stop solution

16 Changes

Changes in current Instructions for Use	
Current Version	007/09.2023
Summary of Changes	Specification of storage conditions component H in chapter 8; specification of shaking frequencies in chapter 9

Anti-GAD₆₅ ELISA

REF KAPM3507

Dosage immunoenzymatique pour la détermination des anticorps contre l'acide glutamique décarboxylase (GAD₆₅) dans le sérum humain



Medipan GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow OT Dahlewitz
Germany

Phone: +49 33708 4417 0
Fax: +49 33708 4417 25
www.medipan.de



DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2
1348 Louvain-la-Neuve
Belgium

Phone: +32 10 84 99 11
Fax: +32 10 84 99 90
www.diasource-diagnostics.com



1 Objectif visé

Le Anti-GAD₆₅ ELISA est un test immunologique quantitatif pour la détermination des anticorps contre l'acide glutamique décarboxylase (GAD₆₅) dans le sérum humain.

Le Anti-GAD₆₅ ELISA est destiné à aider au diagnostic du diabète sucré de type 1 en conjonction avec d'autres résultats cliniques et de laboratoire.

Le Dosage immunoenzymatique est conçu pour un usage professionnel manuel de diagnostic *in vitro*.

2 Pertinence du diagnostic

Le diabète sucré de type 1 est une maladie auto-immune chronique dans laquelle les cellules bêta productrices d'insuline des îlots de Langerhans dans le pancréas sont détruites. La conséquence de cette destruction est une réduction de la production d'insuline, ce qui entraîne une glycémie élevée comme le diabète sucré. Les prédispositions génétiques et les infections virales sont considérées comme des facteurs de risque, mais les causes exactes n'ont pas encore été entièrement clarifiées.

La destruction des cellules bêta productrices d'insuline du pancréas est basée sur la présence d'anticorps des cellules des îlots (ICA), qui sont dirigés contre différents antigènes des cellules des îlots pancréatiques, tels que l'acide glutamique décarboxylase (GAD₆₅), la tyrosine phosphatase (insulinome -associated antigen 2, IA2), le transporteur de zinc 8 (ZnT8) et contre l'insuline. Les anticorps contre les cellules des îlots (ICA) peuvent être détectés chez 70 à 80 % des patients atteints de diabète sucré. Les différents anticorps apparaissent généralement des mois à des années avant l'apparition d'une glycémie élevée et sont donc également considérés comme des marqueurs pronostiques importants pour identifier les patients présentant un risque accru de développer un diabète sucré de type 1. La détection combinée d'anticorps dirigés contre GAD₆₅, IA2, ZnT8 et l'insuline est considérée comme une méthode importante pour diagnostiquer le diabète sucré de type 1 au début de la maladie.

L'acide glutamique décarboxylase (GAD) catalyse la synthèse du neurotransmetteur GABA dans le cerveau et les cellules bêta. Deux isoformes de l'enzyme sont connues : GAD65 avec un poids moléculaire

de 65 kDa et GAD67 avec 67 kDa. Des anticorps dirigés contre GAD₆₅ sont détectés chez la majorité des patients atteints de diabète sucré de type 1 et chez un grand nombre de patients en phase pré-diabétique. En revanche, les patients atteints du très rare syndrome de l'homme raide neuromusculaire ont des anticorps contre les deux isoformes de GAD.

3 Principe du test

Le test ELISA (technique d'immunoabsorption par enzyme liée) est un test immunologique permettant de déterminer la présence d'anticorps spécifiques. Les bandes de la plaque de microtitration sont recouvertes d'antigènes spécifiques au test. Si des anticorps sont présents dans l'échantillon du patient, ils se lient aux antigènes. Un second antigène biotinylé se reconnaît à l'anticorps fixé. Le test utilise la capacité des anticorps à agir de manière bivalente avec des antigènes immobilisés et solubles. La streptavidine conjuguée à l'enzyme peroxydase détecte le complexe immun généré. Un substrat incolore est transformé en produit coloré par la peroxydase. L'intensité du signal du produit de la réaction est proportionnelle à l'activité des anticorps dans l'échantillon. Après l'arrêt, l'intensité du signal du produit de la réaction est mesurée par photométrie.

4 Composants du test

Composant	Description
Plaque de microtitration A MP 1 pièce	12 bandes de microtitration sécables (prêtes à l'emploi), 8 puits par bande chaque puits étant recouvert de GAD ₆₅ humaine recombinante
Calibreur 0 – 5 CAL 6 x 1,0 mL	Dilutions colorées de sérum humain (prêtes à l'emploi ; contiennent du ProClin 950) Les activités des anticorps sont indiquées sur le certificat de contrôle de la qualité.
Contrôle positif CII CONTROL + 1 x 1,0 mL	Dilution colorée de sérum humain (prête à l'emploi ; contient du ProClin 950) L'activité de l'anticorps est indiquée sur le certificat de contrôle de qualité.
Diluant pour échantillon C DIL 1 x 20 mL	Solution colorée (prête à l'emploi ; contient du ProClin 950)
GAD₆₅ -Biotin H START 1 x 0,2 mL	Réactif de départ concentré GAD ₆₅ biotinylée (contient de l'azoture de sodium)
Diluant pour GAD₆₅ - Biotine J BUF H 1 x 20 mL	Solution (prête à l'emploi ; contient du ProClin 950)
Streptavidine-peroxydase (SA-POD) D CONJ 1 x 0,2 mL	Streptavidine concentrée conjuguée à la peroxydase de raifort (100x)
Diluant pour SA-POD G BUF D 1 x 20 mL	Solution (prête à l'emploi ; contient ProClin 950)
Tampon de lavage B WASHB 1 x 100 mL	Solution concentrée (10x ; contient ProClin 950)
Substrat E SUB 1 x 15 mL	3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (prêt à l'emploi)
Solution d'arrêt F STOP 1 x 15 mL	Acide sulfurique 0,25 M (prêt à l'emploi)
Feuille adhésive 2 pièces	-
Certificat QC 1 pièce	-
Mode d'emploi 1 pièce	-

5 Matériel requis mais non fourni

- Matériel de laboratoire courant
- Pipettes de précision (5 - 1000 µL), pipettes multi-canaux (100 - 1000 µL) et embouts de pipette jetables
- Cylindres gradués (100 - 1000 mL)
- Mélangeur vortex ou autres agitateurs rotatifs
- Agitateur de plaques de microtitration
- Laveur de plaques de microtitration ou peigne de lavage
- Lecteur de plaques de microtitration avec filtres optiques pour 450 nm et 620 nm ou 690 nm.
- Papier absorbant ou essuie-tout
- Eau distillée ou désionisée.

6 Stockage et stabilité

Dès réception, tous les composants du test doivent être conservés entre 2 °C et 8 °C, de préférence dans la boîte d'origine du kit. S'ils sont conservés correctement dans leur emballage d'origine, tous les composants sont stables jusqu'à leur date de péremption.

7 Informations générales

Ce produit est destiné à un usage de diagnostic *in vitro* uniquement. Le mode d'emploi doit être lu attentivement avant l'utilisation. Elles ne sont valables que pour le présent produit avec la composition donnée et doivent être strictement suivies pour garantir des résultats de test fiables. Toute déviation peut entraîner des résultats de test erronés. Les composants ne doivent pas être remplacés par des réactifs de test de lots différents ou d'autres fabricants.

La contamination des réactifs doit être évitée par l'utilisation de techniques aseptiques lors du retrait des aliquotes des flacons. Après utilisation, les flacons de réactifs doivent être fermés hermétiquement avec leurs bouchons correspondants. La contamination croisée des échantillons ou des réactifs peut entraîner des résultats de test incohérents et doit être évitée par l'utilisation de techniques de pipetage cohérentes.

L'exposition des réactifs à une forte lumière doit être évitée tout au long de la procédure de test et du stockage.

Un lavage insuffisant entraînera une mauvaise précision et des signaux de mesure élevés. Après chaque étape de lavage, tout fluide résiduel doit être complètement éliminé.

8 Préparation

8.1 Préparation des réactifs

La microplaque et tous les réactifs, à l'exception du concentré de biotine GAD65 (H), doivent être amenés à température ambiante (RT : 18 °C à 25 °C) pendant au moins 30 min avant utilisation. Tous les composants liquides doivent être mélangés délicatement pour assurer leur homogénéité.

8.1.1 Plaque de microtitration

La plaque de microtitration est scellée dans un sac en aluminium. Les bandes de test non utilisées doivent toujours être conservées au réfrigérateur et protégées de l'humidité par le dessiccateur dans le sac en aluminium correctement fermé. Soigneusement refermées, les bandelettes de test peuvent être utilisées pendant 8 semaines après ouverture.

8.1.2 Calibres

Les calibres sont prêts à l'emploi et ne doivent pas être dilués davantage. Les calibres doivent être utilisés lors de chaque essai.

8.1.3 Contrôles

Le contrôle positif est prêt à l'emploi et ne doit plus être dilué. Les contrôles doivent être utilisés dans chaque cycle de test. Les laboratoires peuvent également valider leurs propres échantillons de contrôle et les utiliser à la place.

8.1.4 GAD₆₅ -Biotine (H) et Diluant (J)

Une quantité suffisante de solution de GAD₆₅-Biotine doit être préparée en diluant x mL de GAD₆₅ -Biotine (H) avec y mL de diluant pour GAD₆₅ -Biotine (J) directement avant utilisation. Le concentré doit être conservé entre 2 °C et 8 °C jusqu'à son utilisation. Pour les volumes exacts de dilution x et y, voir le certificat d'analyse fourni avec le kit. Le rapport de dilution pour le traitement manuel et le traitement automatisé peut être différent. La solution de GAD₆₅ -Biotine préparée doit être utilisée dans la journée et ne doit pas être conservée.

8.1.5 Streptavidine-peroxydase (D) et diluant (G)

Une quantité suffisante de solution de streptavidine-peroxydase doit être préparée en diluant le concentré SA-POD (D) 1 + 99 (par exemple, 0,1 ml de concentré SA-POD avec 9,9 ml de diluant pour SA-POD (G)). La solution SA-POD préparée est stable jusqu'à 4 semaines entre 2 °C et 8 °C.

8.1.6 Tampon de lavage

Le tampon de lavage est concentré et doit être dilué au 1:10 avec de l'eau distillée avant utilisation (par exemple 100 mL + 900 mL). Une quantité suffisante de solution de lavage doit être préparée. La solution de lavage diluée peut être conservée entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 30 jours.

8.1.7 Substrat

Le substrat est prêt à l'emploi. L'exposition de la solution de substrat à une lumière forte doit être évitée.

8.1.8 Solution d'arrêt

La solution d'arrêt est prête à l'emploi.

8.2 Préparation des échantillons

8.2.1 Matériel d'échantillonnage

L'utilisation de sérum fraîchement collecté à partir de sang prélevé par ponction veineuse est recommandée. L'utilisation d'échantillons icteriques, lipémiques, hémolytiques ou contaminés par des bactéries doit être évitée. Les substances insolubles doivent être éliminées de l'échantillon par centrifugation. Les échantillons ne doivent pas être inactivés thermiquement.

8.2.2 Stockage des échantillons

Les échantillons peuvent être conservés entre 2 °C et 8 °C jusqu'à trois jours. Le stockage à long terme nécessite -20 °C. Il faut éviter les congélations et décongélations répétées. Pour un usage multiple, les échantillons doivent être aliquotés et conservés à -20 °C.

9 Performance des tests

9.1 Schéma de pipetage

Le schéma de pipetage suivant est recommandé :

	1	2	3	4
A	CAL 0	Échantillon 2		
B	CAL 1	Échantillon 3		
C	CAL 2	Échantillon 4		
D	CAL 3	Échantillon 5		
E	CAL 4	...		
F	CAL 5	...		
G	CII	...		
H	Échantillon 1	...		

9.2 Procédure

Il convient de respecter les durées et les températures d'incubation indiquées et d'éviter les décalages temporels importants lors du pipetage des échantillons et des réactifs. La plaque de microtitration doit être secouée brièvement après l'ajout des réactifs.

Étape	Description
1. Addition du tampon de dilution	Ajouter 100 µl de tampon de dilution prêt à l'emploi dans les puits des échantillons de patients ; laisser les puits des calibrateurs et des contrôles vides.
2. Ajout des calibres, des contrôles et des échantillons	Ajouter 50 µl de calibres, de contrôles et d'échantillons non dilués prêts à l'emploi par puits.
3. Incubation	Couvrir la plaque et incubé pendant 60 minutes à température ambiante en agitant à > 500 tours par minute sur un agitateur de plaque.
4. Préparation des réactifs	Préparer des volumes suffisants de réactifs (B, D/G, H/J)
5. Cycle de lavage	Aspirez la solution et lavez 3 fois avec 300 µL de solution de lavage avec un temps de trempage d'au moins 5 secondes à chaque

	fois ; séchez en tapant la plaque de microtitration sur une serviette en papier pour éliminer toute gouttelette résiduelle.
6. Addition du réactif de départ	Ajouter 100 µL de solution diluée de GAD ₆₅ -Biotine (préparée à partir de H et J) à chaque puits
7. Incubation	Couvrir la plaque et incuber pendant 60 minutes à température ambiante en agitant à > 500 tours par minute sur un agitateur de plaque.
8. Cycle de lavage	Aspirez la solution et lavez 3 fois avec 300 µL de solution de lavage avec un temps de trempage d'au moins 5 secondes à chaque fois ; séchez en tapant la plaque de microtitration sur une serviette en papier pour éliminer toute gouttelette résiduelle.
9. Addition du conjugué	Ajouter 100 µL de SA-POD dilué (préparé à partir de D et G) dans chaque puits.
10. Incubation	Couvrir la plaque et incuber pendant 20 minutes à température ambiante en agitant à > 500 tours par minute sur un agitateur de plaque.
11. Cycle de lavage	Aspirez la solution et lavez 3 fois avec 300 µL de solution de lavage avec un temps de trempage d'au moins 5 secondes à chaque fois ; séchez en tapant la plaque de microtitration sur une serviette en papier pour éliminer toute gouttelette résiduelle.
12. Ajout du substrat	Ajouter 100 µL de substrat prêt à l'emploi dans chaque puits et agiter brièvement la plaque.
13. Incubation	Couvrir la plaque et incuber pendant 20 minutes dans l'obscurité à température ambiante sans agitation.
14. Ajout de la solution d'arrêt	Ajoutez 100 µL de solution d'arrêt prête à l'emploi dans chaque puits et agitez la plaque brièvement.
15. Analyse	Lire la densité optique (DO) à 450 nm contre 620 ou 690 nm dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction.

9.3 Automatisation

Le traitement automatisé des immuno-essais doit être effectué de manière analogue à l'utilisation manuelle et validé par l'utilisateur.

10 Évaluation des tests

10.1 Traçabilité métrologique

L'essai immunologique est étalonné en utilisant comme référence la préparation internationale de l'OMS, code NIBSC 97/550. Les résultats quantitatifs sont exprimés en UI/mL.

10.2 Évaluation quantitative

Pour générer une courbe standard, les signaux optiques (densité optique, DO) des calibrateurs sont tracés en fonction de leurs activités d'anticorps et corrélés par un ajustement logistique à 4 paramètres (4 PL). Les activités d'anticorps d'échantillons inconnus peuvent être dérivées directement de leurs signaux optiques en utilisant la courbe standard générée.

10.3 Critères de validité

Les séries de tests ne sont valables que si les critères de validité suivants sont remplis :

- OD CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4 < CAL 5
- OD CAL 5 > 1,2
- Le contrôle positif doit être évalué positif et présenter une activité d'anticorps dans la plage de validité indiquée sur le certificat de contrôle de qualité.

Si ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être répété.

10.4 Dépannage

En cas de test non valide, il convient de vérifier les dates de péremption et les conditions de stockage, les temps et les températures d'incubation, ainsi que l'étalonnage précis de tous les instruments utilisés. Si aucune raison pour un essai non valide n'a pu être identifiée, veuillez contacter le fournisseur ou le fabricant du produit.

10.5 Gammes de référence

Les plages de référence sont indiquées ci-dessous:

	Interprétation
Activité des anticorps < 5 UI/mL	négatif
Activité des anticorps ≥ 5 UI/mL	positif

En raison des différentes séroprévalences dans les différentes régions, chaque laboratoire doit vérifier les plages de référence par ses propres analyses et les adapter, si nécessaire.

10.6 Interprétation des résultats des tests

Un résultat positif indique la présence d'anticorps spécifiques. Un résultat négatif indique l'absence d'anticorps spécifiques, mais n'exclut pas la possibilité d'une réaction auto-immune. En cas de résultat limite, une évaluation fiable n'est pas possible.

10.7 Limites de la méthode

Dans le cas d'une maladie neurologique rare, le syndrome de l'homme raide (SHR), environ 60 % des patients présentent des anticorps anti-GAD₆₅ dans leur sérum. Les anticorps anti-GAD₆₅ des patients atteints du SHR ont des titres beaucoup plus élevés que ceux des patients atteints de diabète de type 1. C'est la raison pour laquelle les sérums des patients suspectés de SHR doivent être pré-dilués à 1:50 ou 1:100 avec des sérums négatifs pour anti-GAD₆₅. Chez les patients atteints de SHR, les anti-GAD₆₅ sont également présents dans le liquide céphalo-rachidien.

L'interprétation des résultats des tests doit toujours être considérée en combinaison avec le tableau clinique du patient. Le diagnostic ne doit pas être basé sur les résultats d'une seule méthode de diagnostic. Tous les résultats cliniques et de laboratoire doivent être évalués pour établir un diagnostic. Pour le confirmer, il convient de procéder à des examens complémentaires.

11 Caractéristiques de performance

11.1 Caractéristiques des performances analytiques

11.1.1 Sensibilité et spécificité de l'analyse

La limite du blanc (LoB) a été déterminée par une analyse multiple du diluant de l'échantillon. La limite de quantification (LoQ) a été corrélée à un coefficient de variation inter-essai de 20 %.

	Sensibilité analytique
Limite du blanc (LoB)	< 0,5 UI/mL
Limite de quantification (LoQ)	< 1,0 UI/mL

11.1.2 Précision

La précision des résultats du test a été évaluée par la détermination de la variation intra- et inter-essais par l'analyse de multiples échantillons avec différentes activités d'anticorps.

	Précision intra-essai		Précision inter-essais	
	UI/mL	CV (%)	UI/mL	CV (%)
Échantillon 1	17	9,0	15	9,1
Échantillon 2	80	6,1	76	5,5
Échantillon 3	183	5,7	186	5,3

11.1.3 Plage de mesure

Une exactitude, une justesse, une précision, une linéarité et une récupération fiable des résultats de test ont été observées dans la plage de mesure du test, de la LoQ au calibre supérieur, dans des études complètes. Les échantillons dont les résultats de test sont supérieurs au calibre supérieur doivent être signalés comme étant >max. Les échantillons dont les résultats de test sont inférieurs au LoQ doivent être signalés comme <min. Si des résultats de test supérieurs au calibre supérieur sont observés, les échantillons peuvent être testés à une dilution supérieure. L'activité de l'anticorps qui en résulte doit être multipliée par le facteur de dilution supplémentaire.

11.2 Caractéristiques des performances de diagnostic

11.2.1 Sensibilité et spécificité du diagnostic

La sensibilité et la spécificité ont été évaluées par l'analyse d'échantillons de sérum provenant de 74 patients atteints de diabète sucré de type 1 et de 57 échantillons provenant de donneurs de sang non sélectionnés.

	Performance diagnostique
Sensibilité	90,5 %
Spécificité	94,7 %

12 Mises en garde et précautions

Ce produit est conçu exclusivement pour une utilisation dans le cadre de diagnostic *in vitro* par un personnel qualifié, autorisé et formé. Tous les composants du test et les échantillons humains doivent être manipulés avec précaution car ils sont potentiellement dangereux. Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) et toutes les réglementations pertinentes doivent être respectées.

Si le produit est endommagé ou si les informations sur le produit, y compris l'étiquetage, sont fausses ou incorrectes, veuillez contacter le fabricant ou le fournisseur.

Ce produit contient des préparations d'origine humaine et/ou animale. Tout matériel dérivé de fluides corporels humains ou d'organes utilisés pour la préparation des composants a été testé et trouvé négatif pour l'HBsAg (Hépatite B-Virus-surface Antigen) et les anticorps anti-HIV et anti-HCV. Cependant, tous les composants et tous les échantillons de patients doivent être manipulés comme étant potentiellement dangereux, conformément aux lois nationales et aux directives appropriées sur la sécurité biologique.

Comme le produit contient des matériaux potentiellement dangereux, les précautions suivantes doivent être respectées : Ne pas fumer, manger ou boire pendant la manipulation du matériel du kit ou des échantillons. Éviter tout contact direct avec le matériel du kit ou les échantillons en portant des gants de protection, une blouse de laboratoire et des lunettes de sécurité. Ne jamais pipeter le matériel par la bouche. Essuyez rapidement les déversements et lavez soigneusement la surface concernée avec un décontaminant. Se laver soigneusement les mains après utilisation.

Certains des réactifs contiennent du ProClin (< 1,0 %) comme conservateur, qui peut provoquer une sensibilisation de la peau (H317) et ne doit pas être avalé ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses (P280, P333+P313).

Certains réactifs contiennent de l'azote de sodium (< 0,1 %) comme conservateur et ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses. La formation éventuelle d'azotures de métaux lourds dans l'écoulement doit être évitée par un rinçage suffisant à l'eau.

Les informations de la fiche de données de sécurité sur les dangers possibles, les mesures de premiers secours, les mesures en cas de libération involontaire de grandes quantités, la manipulation et le stockage, les équipements de protection individuelle, les informations sur l'élimination ainsi que les informations sur la toxicologie doivent être respectées.

Tout incident grave survenu en rapport avec le dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

13 Élimination

Pour la décontamination et l'élimination, les recommandations du CDC ainsi que les directives et réglementations environnementales locales et nationales pertinentes doivent être respectées. Les échantillons, les matériaux potentiellement contaminés et les déchets infectieux doivent être décontaminés, par exemple par autoclavage pendant 20 minutes à 121 °C.

14 Références

- Batstra MR, Anstoot HJ, Herbrink P: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using β -cell autoantibodies. Clin. Lab. 2001, 47, 497 – 507.
- Seissler J, Hatzigelaki E, Scherbaum WA: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 2001, 109, Suppl 2, 304 – 16.

- Pozzilli P, Manfrini S, Monetini L: Biochemical markers of type 1 diabetes, clinical use. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 2001; 235, 38 – 44.
- Scherthaner G, Hink S, Kopp HP et al.: Progress in the characterization of slowly progressive autoimmune diabetes in adult patients (LADA or type 1.5 diabetes). Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. 2001, 109, Suppl 2, 94 – 108.
- Winter WE, Harris N, Schatz D: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. Clinical Diabetes 2002, 20, 183 – 91.

15 Symboles

	Fabricant
	Marquage de conformité CE
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Numéro de catalogue
	Identifiant unique du dispositif
	Code du lot
	Limite de température
	Date limite d'utilisation
	Consultez le mode d'emploi
	Contient des éléments suffisants pour <n>tests
	Ne pas réutiliser
	Attention
	Avertissement
	Risque biologique
	Tenir à l'écart de la lumière du soleil
	Plaque de microtitration
	Calibreurs
	Contrôle positif
	Réactif de départ
	Diluant pour le réactif de départ
	Conjugué
	Diluant pour le conjugué
	Tampon de lavage
	Substrat
	Solution d'arrêt

16 Changements

Modifications du mode d'emploi actuel	
Version actuelle	007/09.2023
Résumé des changements	Précision des conditions de stockage du composant H au chap. 8 ; précision des fréquences d'agitation au chap. 9.

Anti-GAD₆₅ ELISA

REF KAPM3507

Inmunoensayo enzimático para la determinación de anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD₆₅) en suero humano



Medipan GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow OT Dahlewitz
Germany
Phone: +49 33708 4417 0
Fax: +49 33708 4417 25
www.medipan.de



DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2
1348 Louvain-la-Neuve
Belgium
Phone: +32 10 84 99 11
Fax: +32 10 84 99 90
www.diasource-diagnostics.com



1 Uso previsto

El Medizym[®] anti-GAD M es un inmunoensayo cuantitativo para la determinación de anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD₆₅) en suero humano.

El Medizym[®] anti-GAD M está pensado como ayuda en el diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 1 en conjunción con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

El inmunoensayo está diseñado para uso manual por profesionales en el diagnóstico *in vitro*.

2 Relevancia del diagnóstico

La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad autoinmune crónica en la que se destruyen las células beta productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas. La consecuencia de esta destrucción es una producción reducida de insulina, lo que se traduce en niveles elevados de azúcar en sangre como la diabetes mellitus. Las predisposiciones genéticas y las infecciones virales se consideran factores de riesgo, pero las causas exactas aún no se han aclarado por completo.

La destrucción de las células beta del páncreas productoras de insulina se basa en la presencia de anticuerpos contra las células de los islotes (ICA), que se dirigen contra diferentes antígenos de las células de los islotes pancreáticos, como el ácido glutámico descarboxilasa (GAD₆₅), la tirosina fosfatasa (insulinoma -antígeno asociado 2, IA2), el transportador de zinc 8 (ZnT8) y contra la insulina. Los anticuerpos contra las células de los islotes (ICA) se pueden detectar en el 70-80% de los pacientes con diabetes mellitus. Los diferentes anticuerpos suelen aparecer meses o años antes de la aparición de niveles elevados de azúcar en sangre y, por lo tanto, también se consideran marcadores pronósticos importantes para identificar a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 1. La detección combinada de anticuerpos contra GAD₆₅, IA2, ZnT8 y La insulina se considera un método importante para diagnosticar la diabetes mellitus tipo 1 al inicio de la enfermedad.

El ácido glutámico descarboxilasa (GAD) cataliza la síntesis del neurotransmisor GABA en el cerebro y en las células beta. Se conocen dos isoformas de la enzima: GAD65 con un peso molecular de 65 kDa y

GAD67 con 67 kDa, respectivamente. Los anticuerpos dirigidos contra GAD65 se observan en la mayoría de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y en un gran número de individuos en fase prediabética. Por el contrario, los anticuerpos dirigidos contra ambas isoformas de GAD se encuentran en pacientes con el muy raro síndrome del hombre rígido neuromuscular.

3 Principio de la prueba

El ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) es un inmunoensayo para la determinación de anticuerpos específicos. Las tiras de la placa de microtitulación están recubiertas con antígenos específicos de la prueba. Si los anticuerpos están presentes en la muestra del paciente, se unen a los antígenos. Un segundo antígeno biotinilado se une al anticuerpo inmovilizado. El ensayo utiliza la capacidad de los anticuerpos para actuar de forma bivalente con antígenos inmovilizados y solubles. La estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa detecta el inmunocomplejo generado. Un sustrato incoloro se convierte en el producto coloreado por la peroxidasa. La intensidad de la señal del producto de la reacción es proporcional a la actividad del anticuerpo en la muestra. Después de parar de la reacción, la intensidad de la señal del producto de reacción se mide fotométricamente.

4 Componentes de la prueba

Componente	Descripción
Placa de microtitulación A MP 1 pieza	12 tiras de microtitulación desprendibles (lista para usar), 8 pocillos por tira, cada pocillo recubierto con GAD ₆₅ recombinante humano
Calibrador 0 - 5 CAL 6 x 1,0 mL	Diluciones coloreadas de suero humano (listo para usar; contiene ProClin 950) Las actividades de los anticuerpos se indican en el certificado de CC.
Control positivo CII CONTROL + 1 x 1,0 mL	Dilución coloreada de suero humano (listo para usar; contiene ProClin 950) La actividad de los anticuerpos se indica en el certificado de CC.
Diluyente de la muestra C DIL 1 x 20 mL	Solución coloreada (listo para usar; contiene ProClin 950)
GAD₆₅-Biotina H START 1 x 0,2 mL	Reactivo inicial concentrado GAD ₆₅ biotinilado (contiene azida sódica)
Diluyente para GAD₆₅-Biotina J BUF H 1 x 20 mL	Solución (listo para usar; contiene ProClin 950)
Estreptavidina-peroxidasa (SA-POD) D CONJ 1 x 0,2 mL	Estreptavidina concentrada conjugada con peroxidasa de rábano (100x)
Diluyente para SA-POD G BUF D 1 x 20 mL	Solución (listo para usar; contiene ProClin 950)
Tampón de lavado B WASHB 1 x 100 mL	Solución concentrada (10x; contiene ProClin 950)
Sustrato E SUB 1 x 15 mL	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (listo para usar)
Solución de parada F STOP 1 x 15 mL	Ácido sulfúrico 0,25 M (lista para usar)
Película adhesiva 2 piezas	-
Certificado de CC 1 pieza	-
Instrucciones de uso 1 pieza	-

5 Materiales requeridos pero no proporcionados

- Equipos de laboratorio comunes
- Pipetas de precisión (5 - 1000 µL), pipetas multicanal (100 - 1000 µL) y puntas de pipeta desechables
- Cilindros graduados (100 - 1000 mL)
- Mezclador de vórtice u otros rotadores
- Agitador de placas de microtitulación
- Lavador de placas de microtitulación o peine de lavado
- Lector de microplacas con filtros ópticos para 450 nm y 620 nm o 690 nm
- Papel absorbente
- Agua destilada o desionizada

6 Almacenamiento y estabilidad

Una vez recibidos, todos los componentes de la prueba deben almacenarse entre 2 °C y 8 °C, preferiblemente en su empaque original. Si se almacenan correctamente en sus empaques originales, todos los componentes son estables hasta su fecha de caducidad.

7 Información general

Este producto es para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*. Las instrucciones de uso deben leerse cuidadosamente antes del uso. Estas son válidas solo para el presente producto con la composición dada y deben seguirse estrictamente para garantizar resultados confiables de las pruebas. Las desviaciones pueden conducir a resultados erróneos. Los componentes no deben cambiarse por reactivos de otras pruebas de diferentes lotes o fabricantes.

Debe evitarse la contaminación de los reactivos mediante el uso de técnicas asépticas al extraer alícuotas de los viales. Tras su uso, los viales de reactivos deben cerrarse herméticamente con sus correspondientes tapones. La contaminación cruzada de muestras o reactivos puede generar resultados inconsistentes y debe evitarse mediante el uso de técnicas de pipeteo uniformes.

Debe evitarse la exposición a la luz intensa de los reactivos durante todo el procedimiento de la prueba y el almacenamiento.

Un lavado insuficiente dará lugar a una mala precisión y a elevadas señales de medición. Después de cada paso de lavado, cualquier líquido residual debe eliminarse por completo.

8 Preparación

8.1 Preparación de reactivos

La placa de microtitulación y todos los reactivos, excepto el concentrado de biotina GAD65 (H), deben ponerse a temperatura ambiente (RT: 18 °C a 25 °C) durante al menos 30 minutos antes de su uso. Todos los componentes líquidos deben mezclarse suavemente para garantizar la homogeneidad.

8.1.1 Placa de microtitulación

La placa de microtitulación está sellada en una bolsa de aluminio. Las tiras reactivas no utilizadas deben almacenarse refrigeradas y protegidas de la humedad con el desecante dentro de la bolsa de aluminio debidamente sellada. Las tiras reactivas bien selladas se pueden utilizar durante 8 semanas después de su apertura.

8.1.2 Calibradores

Los calibradores están listos para usar y no deben diluirse. Los calibradores deben utilizarse en cada prueba.

8.1.3 Controles

El control positivo está listo para usar y no debe diluirse más. Los controles deben utilizarse en cada prueba. El laboratorio también puede validar sus propias muestras de control y usarlas alternativamente.

8.1.4 GAD₆₅-Biotina (H) y Diluyente (J)

Debe prepararse una cantidad suficiente de solución de GAD₆₅-Biotina diluyendo x mL de GAD₆₅-Biotina (H) con y mL de diluyente para GAD₆₅-Biotina (J) directamente antes del uso. El concentrado debe conservarse entre 2 °C y 8 °C hasta su utilización. Para obtener los volúmenes exactos de dilución x e y, consulte el certificado de análisis suministrado con el kit. La relación de dilución para el procesamiento manual y automatizado puede ser diferente. La solución de GAD₆₅-Biotina preparada debe usarse en el plazo de un día y no debe almacenarse.

8.1.5 Estreptavidina-peroxidasa (D) y diluyente (G)

Debe prepararse una cantidad suficiente de solución de estreptavidina-peroxidasa diluyendo el concentrado SA-POD (D) 1 + 99 (por ejemplo, 0,1 mL de concentrado SA-POD con 9,9 mL de diluyente para SA-POD (G). La solución de SA-POD preparada es estable hasta por 4 semanas con una temperatura entre 2 °C a 8 °C.

8.1.6 Tampón de lavado

El tampón de lavado está concentrado y debe diluirse 1:10 con agua destilada antes de su uso (por ejemplo, 100 mL + 900 mL). Debe prepararse una cantidad suficiente de solución de lavado. La solución de lavado preparada puede almacenarse entre 2 °C y 8 °C hasta por 30 días.

8.1.7 Sustrato

El sustrato está listo para usar. Debe evitarse la exposición del sustrato a fuentes de luz intensa.

8.1.8 Solución de parada

La solución de parada está lista para usar.

8.2 Preparación de las muestras

8.2.1 Material de muestra

Se recomienda el uso de suero recién extraído de sangre por punción venosa. Debe evitarse el uso de muestras ictericas, lipémicas, hemolíticas o contaminadas con bacterias. Las sustancias insolubles deben eliminarse de la muestra mediante centrifugación. Las muestras no deben ser inactivadas térmicamente.

8.2.2 Almacenamiento de muestras

Las muestras pueden conservarse entre 2 °C y 8 °C hasta por tres días. El almacenamiento a largo plazo requiere -20 °C. Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas. Para uso múltiple, las muestras deben dividirse en alícuotas y conservadas a -20 °C.

9 Rendimiento de la prueba

9.1 Esquema de pipeteo

El siguiente esquema de pipeteo es recomendado:

	1	2	3	4
A	CAL 0	Muestra 2		
B	CAL 1	Muestra 3		
C	CAL 2	Muestra 4		
D	CAL 3	Muestra 5		
E	CAL 4	...		
F	CAL 5	...		
G	CII	...		
H	Muestra 1	...		

9.2 Procedimiento

Deben respetarse los tiempos y temperaturas de incubación indicados, y deben evitarse significativos cambios de tiempo durante el pipeteo de muestras y reactivos. La placa de microtitulación debe agitarse brevemente después de agregar los reactivos.

Paso	Descripción
1. Adición del tampón de dilución	Agregue 100 µl de tampón de dilución listo para usar en los pocillos de las muestras de cada paciente; deje vacíos los pocillos de los calibradores y controles.
2. Adición de calibradores, controles y muestras	Agregue 50 µL de calibradores y controles listos para usar y muestras sin diluir por pocillo
3. Incubación	Cubra la placa e Incube durante 60 min a TA mientras se agita a > 500 rpm en un agitador de placas
4. Preparación de reactivos	Preparar suficientes volúmenes de reactivos (B, D/G, H/J)
5. Ciclos de lavados	Aspire la solución y lave 3 veces con 300 µl de solución de lavado con un tiempo de remojo de al menos 5 s cada uno; secar golpeando la placa de microtitulación sobre una toalla de papel para eliminar cualquier gota residual

6. Adición del reactivo de inicio	Agregue 100 µL de solución diluida de GAD ₆₅ -Biotina (preparada a partir de H y J) a cada pocillo
7. Incubación	Cubra la placa e Incube durante 60 min a TA mientras se agita a > 500 rpm en un agitador de placas
8. Ciclos de lavados	Aspire la solución y lave 3 veces con 300 µl de solución de lavado con un tiempo de remojo de al menos 5 s cada uno; secar golpeando la placa de microtitulación sobre una toalla de papel para eliminar cualquier gota residual
9. Adición del conjugado	Agregue 100 µl de SA-POD diluido (preparado a partir de D y G) a cada pocillo
10. Incubación	Cubra la placa e Incube durante 20 min a TA mientras se agita a > 500 rpm en un agitador de placas
11. Ciclos de lavados	Aspire la solución y lave 3 veces con 300 µl de solución de lavado con un tiempo de remojo de al menos 5 s cada uno; secar golpeando la placa de microtitulación sobre una toalla de papel para eliminar cualquier gota residual
12. Adición de sustrato	Agregue 100 µl de sustrato listo para usar en cada pocillo y agite la placa brevemente
13. Incubación	Cubra la placa e Incube durante 20 min en la oscuridad a TA sin agite
14. Adición de la solución de parada	Agregue 100 µl de solución de parada lista para usar en cada pocillo y agite la placa brevemente
15. Análisis	Lea la densidad óptica (DO) a 450 nm frente a 620 o 690 nm en 30 min después de detener la reacción

9.3 Automatización

El procesamiento automatizado de los inmunoensayos debe realizarse de forma análoga al uso manual y debe ser validado por el usuario.

10 Evaluación de la prueba

10.1 Trazabilidad metrológica

El inmunoensayo se calibra utilizando la preparación de referencia internacional de la OMS, código NIBSC 97/550. Los resultados cuantitativos se expresan en UI/mL.

10.2 Evaluación cuantitativa

Para generar una curva de calibración, las señales ópticas (densidad óptica, DO) de los calibradores se representan frente a sus actividades de anticuerpos y se correlacionan mediante un ajuste logístico de 4 parámetros (4 PL). Las actividades de anticuerpos de muestras desconocidas pueden extrapolarse directamente de sus señales ópticas mediante el uso de la curva de calibración generada.

10.3 Criterios de Validez

Las pruebas son válidas solo si cumplen con los siguientes criterios de validez:

- OD CAL 0 < CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4; < CAL 5
- OD CAL 5 > 1,2.
- El control positivo debe ser valorado como positivo y presentar una actividad de anticuerpos dentro del rango de validez indicado en el certificado de CC.

Si no se cumplen estos criterios, la prueba no es válida y debe repetirse.

10.4 Solución de problemas

En caso de una prueba no válida, se deben verificar las fechas de caducidad y las condiciones de almacenamiento, los tiempos y temperaturas de incubación y la calibración precisa de todos los instrumentos utilizados. Si no se puede identificar la razón de una prueba inválida, póngase en contacto con el proveedor o fabricante del producto.

10.5 Rangos de referencia

Los rangos de referencias son indicados continuación:

	Interpretación
Actividad de los anticuerpos < 5 UI/mL	negativo
Actividad de los anticuerpos ≥ 5 UI/mL	positivo

Debido a las diferentes seroprevalencias en cada región, cada laboratorio debe verificar sus rangos de referencia mediante su propio análisis y adaptarlos, si es necesario.

10.6 Interpretación de los resultados de las pruebas

Un resultado positivo indica la presencia de anticuerpos específicos. Un resultado negativo indica la ausencia de anticuerpos específicos, pero no excluye la posibilidad de una reacción autoinmune. En caso de un resultado incierto de la prueba, no es posible una evaluación confiable.

10.7 Limitaciones del método

En el raro trastorno neurológico del síndrome de la persona rígida (SPR), alrededor del 60% de los pacientes tienen anti-GAD₆₅ en su suero. Los anti-GAD₆₅ de los pacientes con SPR tienen títulos mucho más altos en comparación con los de pacientes con diabetes tipo 1. Por esta razón, los sueros de pacientes con sospecha de SPR deben prediluirse 1:50 o 1:100 con sueros negativos a los anti-GAD₆₅. Los anti-GAD₆₅ también ocurren en líquido cefalorraquídeo de pacientes con SPR.

La interpretación de los resultados de las pruebas debe considerarse siempre en combinación con el cuadro clínico del paciente. El diagnóstico no debe basarse en los resultados de un único método diagnóstico. Todos los hallazgos clínicos y de laboratorio deben evaluarse para establecer un diagnóstico. Para confirmarlo, se deben realizar más investigaciones.

11 Características de rendimiento

11.1 Características de rendimiento analítico

11.1.1 Sensibilidad y especificidad analítica

El límite del blanco (LoB) se determinó mediante análisis múltiples del diluyente de la muestra. El límite de cuantificación (LoQ) se correlacionó con un coeficiente de variación interensayo del 20 %.

	Sensibilidad analítica
Límite del blanco (LoB)	< 0,5 UI/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	< 1,0 UI/mL

11.1.2 Precisión

La precisión de los resultados de la prueba se evaluó mediante la determinación de la variación intra- e inter-ensayo, mediante el análisis de múltiples muestras con diferentes actividades de anticuerpos.

	Precisión intraensayo		Precisión interensayo	
	IU/mL	CV (%)	IU/mL	CV (%)
Muestra 1	17	9,0	15	9,1
Muestra 2	80	6,1	76	5,5
Muestra 3	183	5,7	186	5,3

11.1.3 Rango de medición

Se han observado exactitud, veracidad, precisión, linealidad y recuperación confiables de los resultados de las pruebas dentro del rango de medición del ensayo desde el LoQ hasta el calibrador superior en estudios exhaustivos. Las muestras con resultados por encima del calibrador superior deben informarse como >máx. Las muestras con resultados por debajo del LoQ deben informarse como <min. Si se observan resultados por encima del calibrador superior, las muestras pueden analizarse a una dilución más alta. La actividad de anticuerpos resultante debe multiplicarse por el factor de dilución adicional.

11.2 Características de rendimiento del diagnóstico

11.2.1 Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad y la especificidad se evaluaron mediante el análisis de muestras de suero de 74 pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 y 57 muestras de donantes de sangre no seleccionados.

	Rendimiento del diagnóstico
Sensibilidad	90,5 %
Especificidad	94,7 %

12 Advertencias y precauciones

El producto está diseñado exclusivamente para uso en diagnóstico *in vitro* por personal calificado, autorizado y capacitado. Todos los componentes de la prueba y las muestras humanas deben manipularse con cuidado, ya que son potencialmente peligrosos. Se deben cumplir

las buenas prácticas de laboratorio (BPL) y todas las reglamentaciones pertinentes.

En caso de que el producto esté dañado o la información del producto, incluido el etiquetado, sea errónea o incorrecta, póngase en contacto con el proveedor o fabricante.

Este producto contiene preparados de origen humano y/o animal. Cualquier material derivado de fluidos corporales humanos u órganos utilizados para la preparación de componentes, se analizó y resultó negativo para HBsAg (antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B) y anticuerpos anti-VIH y anti-VHC. Sin embargo, todos los componentes y todas las muestras de pacientes deben manipularse como potencialmente peligrosos de acuerdo con las leyes nacionales y las directrices adecuadas sobre seguridad biológica.

Dado que el producto contiene materiales potencialmente peligrosos, deben seguirse las siguientes precauciones: No fume, coma ni beba mientras se manipula el material del kit o las muestras. Evite el contacto directo con el material del kit o las muestras utilizando guantes de protección, bata de laboratorio y gafas de seguridad. Nunca pipeteo el material con la boca. Limpie los derrames rápidamente y lave bien la superficie afectada con un descontaminante. Lávese bien las manos después de su uso.

Algunos de los reactivos contienen ProClin (< 1,0 %) como conservante, pueden causar sensibilización de la piel (H317) y no deben ser ingeridos ni deben entrar en contacto con la piel o las mucosas (P280, P333+P313).

Algunos de los reactivos contienen azida sódica (< 0,1 %) como conservante y no deben ser ingeridos ni permitirse que entren en contacto con la piel o las mucosas. La posible formación de azidas de metales pesados en el drenaje debe evitarse mediante un enjuague suficiente con agua.

Debe observarse la información de la ficha de datos de seguridad sobre posibles peligros, medidas de primeros auxilios, medidas en caso de liberación involuntaria de grandes cantidades, manipulación y almacenamiento, equipo de protección personal, información sobre desecho, así como información sobre toxicología.

Cualquier incidente grave que haya ocurrido en relación con el producto se comunicará al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

13 Desecho

Para la descontaminación y desecho deben cumplir las recomendaciones del CDC, así como las directrices y reglamentos medioambientales locales y nacionales pertinentes. Las muestras, los materiales potencialmente contaminados y los residuos infecciosos deben descontaminarse, por ejemplo, mediante autoclave durante 20 min a 121 °C.

14 Referencias

- Batstra MR, Anstoot HJ, Herbrink P: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using β -cell autoantibodies. Clin. Lab. 2001, 47, 497 – 507.
- Seissler J, Hatzigelaki E, Scherbaum WA: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 2001, 109, Suppl 2, 304 – 16.
- Pozzilli P, Manfrini S, Monetini L: Biochemical markers of type 1 diabetes, clinical use. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 2001; 235, 38 – 44.
- Scherthaner G, Hink S, Kopp HP et al.: Progress in the characterization of slowly progressive autoimmune diabetes in adult patients (LADA or type 1.5 diabetes). Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. 2001, 109, Suppl 2, 94 – 108.

- Winter WE, Harris N, Schatz D: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. Clinical Diabetes 2002, 20, 183 – 91.

15 Símbolos

	Fabricante
	Marcado CE de conformidad
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de catálogo
	Identificador único del dispositivo
	Código de lote
	Límite de temperatura
	Fecha de caducidad
	Consulte las instrucciones de uso
	Contiene suficiente para <n> pruebas
	No reutilizar
	Precaución
	Advertencia
	Riesgo biológico
	Mantenga alejado de la luz solar
	Placa de microtitulación
	Calibradores
	Control positivo
	Potenciador
	Reactivo de inicio
	Diluyente para el reactivo de inicio
	Conjugado
	Diluyente para el conjugado
	Tampón de lavado
	Sustrato
	Solución de parada

16 Cambios

Cambios en las actuales instrucciones de uso	
Versión actual	007/09.2023
Resumen de los cambios	Aclaración de las condiciones de almacenamiento del componente H en el capítulo 8; aclaración de las frecuencias de agitación en el capítulo 9.