



DCM082-6
Ed. 12/2023

Anti GAD

Test ELISA quantitativo per la determinazione degli autoanticorpi circolanti contro gli antigeni GAD

per analisi di routine

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO082

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Anti GAD è un test ELISA quantitativo in vitro mirato alla determinazione degli autoanticorpi circolanti contro gli antigeni GAD (acido glutammico decarbossilasi) in soggetti prediabetici ad alto rischio e in pazienti diabetici IDDM.

Il kit Anti GAD è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il diabete di tipo 1, anche conosciuto come mellito insulino-dipendente (IDDM), è caratterizzato dalla distruzione autoimmune cronica delle cellule-beta pancreatiche secernenti insulina. Questa patogenesi è dovuta probabilmente all'esposizione di soggetti geneticamente suscettibili ad agenti ambientali. Si pensa che la distruzione autoimmune delle cellule-beta pancreatiche sia completamente asintomatica fino alla perdita dell'80-90% delle cellule. Questo processo può iniziare a qualsiasi età e può durare anni per essere completato. Durante la fase preclinica, questo processo autoimmune è evidenziabile per la presenza di autoanticorpi circolanti contro gli antigeni delle cellule pancreatiche beta. Questi autoanticorpi come l'anti-acido glutammico decarbossilasi (GAD), l'anti-insulina (IAA), and anti-tyrosine phosphatase ICA 512 (IA2) compaiono anni prima dello sviluppo del diabete tipo 1 e prima della comparsa dei sintomi clinici. GAD, l'enzima che catalizza la conversione del glutammato in GABA, è stata identificata in due isoforme, con peso molecolare 65.000 (GAD65) e 67.000 (GAD67). Benché gli autoanticorpi GAD si trovino sia nel diabete di tipo 1 che nel raro disordine neurologico detto sindrome di Stiff-man (SMS), il profilo degli autoanticorpi GAD nelle due malattie differisce.

Gli autoanticorpi dei pazienti SMS riconoscono una combinazione di epitopi GAD lineare e conformazionale mentre gli autoanticorpi GAD65 nei pazienti con diabete di tipo 1 sono prevalentemente diretti contro epitopi conformazionali. **Gli autoanticorpi GAD 65 (GAD 65 Ac) sono presenti in 70-80% dei pazienti con nuova diagnosi di diabete di tipo 1.**

La combinazione degli autoanticorpi contro GAD65 e IA2 è molto importante per la valutazione del rischio di diabete di tipo 1 in bambini e adolescenti. La combinazione di questi test risulta più sensibile e

predittiva che non gli ICA nei gruppi a rischio, quali ad esempio i parenti dei pazienti con diabete di tipo 1.

Autoanticorpi GAD65 sono anche presenti in sottogruppi di adulti con diabete di tipo 2. Questi pazienti possono avere iperglicemia, e dopo terapia con agenti ipoglicemicizzanti che varia da qualche mese a anni, possono diventare insulino dipendenti. Si pensa che questi pazienti abbiano una forma lenta e progressiva di diabete di tipo 1, spesso chiamata diabete latente o diabete autoimmune latente degli adulti (LADA).

La presenza degli autoanticorpi GAD65 nel siero di tali pazienti è un marcatore sensibile e specifico per la futura dipendenza all'insulina.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test utilizza la capacità degli autoanticorpi GAD65 di agire bivalentemente e di formare un ponte tra il GAD immobilizzato in piastra e la GAD65 biotilinata. Nella prima fase gli autoanticorpi dei campioni si fissano al GAD65 immobilizzato sulle micropiastre. Nella seconda fase la Biotin-GAD65 si fissa a sua volta a questo complesso. La Biotin-GAD65 fissata è proporzionale alla quantità di autoanticorpi GAD65 nel siero del paziente. La biotin-GAD65 non fissata è eliminata per lavaggio. La biotin-GAD65 fissata può essere quantificata per aggiunta di Streptavidin-peroxidase e di un substrato cromogenico (TMB) con successiva lettura della densità ottica (DO) a 450 nm. La concentrazione di anticorpi contro il GAD è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (5 flaconi, 0,7 mL ciascuno)

CAL1	REF DCE002/8207-0
CAL2	REF DCE002/8208-0
CAL3	REF DCE002/8209-0
CAL4	REF DCE002/8210-0
CAL5	REF DCE002/8211-0

2. Controlli (2 flaconi, 0,7 mL ciascuno, pronti all'uso)

Controllo Negativo	REF DCE045/8201-0
Controllo Positivo	REF DCE045/8202-0

3. 20X Conc. Streptavidin-peroxidase (1 flacone, 0,7 mL)
REF DCE041/8241-0

4. Streptavidin-peroxidase diluent (1 flacone, 15 mL)
REF DCE048/8248-0
5. GAD65 Biotin (3 flaconi, liofilizzato)
REF DCE019/8219-0
6. Biotin diluent (2 flaconi, 15 mL ciascuno)
REF DCE047/8247-0
7. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)
GAD purificato adsorbito su micropiastra)
REF DCE002/8203-0
8. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE004/8204-0
9. Stop Solution (1 flacone, 12 mL)
Acido solforico 0.25M (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE005/8205-0
10. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 125 mL)
REF DCE006/8206-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata o deionizzata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce. Aprire la busta del Reattivo 7 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori ed i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN₃) o di ProClin™ 300 come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.

- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

20X Conc. Streptavidin-peroxidase

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P272 - Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere l'udito.

P302+P352 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua.

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

P501 - Smaltire il contenuto/contenitore in un punto di raccolta rifiuti pericolosi o speciali, in conformità con la normativa locale, regionale, nazionale e/o internazionale.

TMB Substrate

Tossicità per la riproduzione, categoria 1B



Pericolo

Indicazioni di pericolo:

H360D - Può nuocere al feto.

Consigli di prudenza:

P202 - Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere l'udito.

P308+P313 - IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.

P501 - Smaltire il contenuto/contenitore in un punto di raccolta rifiuti pericolosi o speciali, in conformità con la normativa locale, regionale, nazionale e/o internazionale.

Streptavidin-peroxidase diluent

Indicazioni di pericolo:

EUH208 - Può provocare una reazione allergica.

Consigli di prudenza:

N/A

- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- **ATTENZIONE: il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni**; si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; **questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso**. A tale scopo Dia.Metra rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.

- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione della Biotin

Preparare una quantità sufficiente di soluzione Biotin GAD65 ricostituendo un flacone di biotina liofilizzata con 5.5 mL di diluente per la Biotin GAD65 direttamente prima l'uso. Questa soluzione può essere conservata a 2-8°C per 3 giorni.

6.2. Preparazione del Wash Solution

Preparare una quantità sufficiente di wash solution diluendo la 10X Conc. Wash Solution 1:10 con acqua distillata o deionizzata. Per esempio, diluire 50 mL della soluzione concentrata con 450 mL di acqua distillata. La soluzione non deve presentare cristalli prima della diluizione; eventualmente dissolvere i cristalli scaldando al max a 37°C. La soluzione diluita può essere conservata a 2-8°C fino a 30 giorni.

6.3. Preparazione della streptavidin peroxidase

Preparare una quantità sufficiente di soluzione di Streptavidin-peroxidase diluendo il concentrato (20X) di Streptavidin-peroxidase 1:20 con lo Streptavidin-peroxidase diluent (per esempio, 0,25 mL Streptavidin-peroxidase concentrata + 4,75 mL di diluent). La soluzione preparata è stabile fino a 16 settimane a 2-8°C.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.

- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₁-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibrator	Campione /Controlli	Bianco
Campione		25 µL	
Calibrator C ₁ -C ₅	25 µL		
Controlli		25 µL	
Sigillare la piastra con la pellicola di plastica e incubare per 1 ora a temperatura ambiente (22-28°C) agitando > 500 rpm. Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione wash diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.			
GAD65 Biotin	100 µL	100 µL	
Sigillare la piastra con la pellicola di plastica e incubare per 1 ora a temperatura ambiente (22-28°C) agitando > 500 rpm. Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione wash diluita. Lavaggi: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			
Streptavidin-peroxidase	100 µL	100 µL	
Sigillare la piastra con la pellicola di plastica e incubare per 20 minuti a temperatura ambiente (22-28°C) agitando > 500 rpm. Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione wash diluita. Lavaggi: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 20 minuti al buio a temperatura ambiente (22 - 28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. RISULTATI

7.1. Curva di calibrazione

La curva di calibrazione è stabilita tracciando i valori medi delle DO degli Calibrator 1-5 sull'asse delle ordinate (asse y) contro le loro rispettive concentrazioni degli Ac GAD65 sulle ascisse (asse x). Utilizzare inoltre il controllo negativo (CI) (vedere sotto).

La concentrazione degli anticorpi GAD65 dei controlli e dei campioni incogniti sono letti direttamente in IU/mL riportando il valore della DO a 450 nm sulla curva di calibrazione.

Il kit anti GAD può essere anche utilizzato con Computer Assisted Analysis utilizzando un software in grado di tracciare curve con spline smoothing fit.

Esempio:

Campione	DO (a) 450 nm	DO (b) 450 nm	DO (media)	IU/mL
Control CI	0.145	0.121	0.133	1
Calibrator 1	0.244	0.283	0.264	5
Calibrator 2	0.351	0.391	0.371	18
Calibrator 3	0.684	0.740	0.712	35
Calibrator 4	1.765	1.868	1.817	120
Calibrator 5	3.397	3.702	3.550	250
Control CII	---	---	---	---
Paziente 1	0.850	0.857	0.854	41.8

7.2. Valori di riferimento

Anti GAD	
Negativo	< 5.0 IU/mL
Positivo	≥ 5.0 IU/mL

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

8. CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA

8.1. Calibrazione

Il kit Anti GAD è calibrato contro le preparazioni di riferimento WHO NIBSC 97/550 perciò le concentrazioni di anticorpi GAD65 sono espresse in IU/mL.

8.2. Linearità

Considerando la natura eterogenea della popolazione degli anticorpi, la loro specificità e affinità, i valori teorici attesi per le diluizioni degli anticorpi GAD65, in alcuni casi potrebbero non corrispondere alla concentrazione misurata nel corso di un test di recupero.

8.3. Specificità e Sensibilità

Usando un cut-off di 5 IU/mL, il kit Anti GAD ha una sensibilità di 88.6% e una specificità di 92.3%, per pazienti con nuovo sviluppo di diabete di tipo 1.

8.4. Limiti di rilevazione

La sensibilità analitica del kit Anti GAD è 0.24 IU/mL.

8.5. Variazione intra e inter-assay

8.5.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando 12 volte quattro diversi sieri con valori situati dentro il range di lavoro della curva di calibrazione. La variabilità intra-assay è $\leq 7,6\%$

8.5.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la misura di un siero di controllo con kit appartenenti a lotti diversi e/o con diverse combinazioni di lotti di reagenti. La variabilità inter-assay è $\leq 8,2\%$.

9. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Batstra M, Anstoot H, Herbrink P: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using β -cell autoantibodies. Clin Lab 2001; 47:497-507
2. Seissler J, Hatziagelaki E, Scherbaum WA: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001; 109 Suppl 2: S304-S316
3. Pozzilli P, Manfrini S, Monetini L: Biochemical markers of type 1 diabetes; clinical use. Scand J Clin Lab Invest 2001; 61:38-44
4. Schernthaner 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; Suppl 2: S94-S108
5. Winter WE, Harris N, Schatz D: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. Clinical Diabetes 2002; 20: 183-191



DCM082-6
Ed. 12/2023

Anti GAD

for routine analysis

Quantitative ELISA test for the detection of circulating autoantibodies against GAD antigens.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO082

INTENDED USE

Anti GAD kit is an in vitro quantitative ELISA test for the determination of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD65 Abs) in human serum of prediabetic high risk individuals as well as IDDM diabetic patients.

Anti GAD kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

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 environmental agents. 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, such as anti-insulin (IAA), anti-glutamic acid decarboxylase (GAD) and anti-tyrosine phosphatase ICA 512 (IA2), are present years before the onset of type 1 diabetes and prior to clinical symptoms.

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.

Autoantibodies of SMS patients recognize a combination of linear and conformational epitopes of GAD while GAD65 autoantibodies in patients with type 1 diabetes are predominantly directed to the conformational epitopes. **GAD65 autoantibodies (GAD65 Abs) are present in 70-80% of newly diagnosed patients with type 1 diabetes.**

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 patients with type 1 diabetes.

GAD65 Abs also occur in a subset of adults with type 2 diabetes. 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, often called latent diabetes or latent autoimmune diabetes in adults (LADA).

The presence of GAD65 Abs in sera of such patients is a sensitive and specific marker for future insulin dependency.

2. PRINCIPLE

The assay system uses the ability of GAD65 Abs acting divalently and forming a bridge between immobilized GAD65 and liquid-phase GAD65-Biotin. In the first step GAD65 Ab from the sample bind to GAD65 coated on the microtiter plate. In a second step GAD65-Biotin binds to this complex. The bound GAD65-Biotin correlates with the amount of GAD65 Abs in patient's serum. Unbound GAD65-Biotin is removed by washing.

The bound GAD65-Biotin could be quantified by addition of Streptavidin-peroxidase and a chromogenic substrate (TMB) and then reading the optical density (OD) at 450 nm.

Anti GAD antibodies concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

- Calibrators (5 vials, 0.7 mL each)

CAL1	REF DCE002/8207-0
CAL2	REF DCE002/8208-0
CAL3	REF DCE002/8209-0
CAL4	REF DCE002/8210-0
CAL5	REF DCE002/8211-0
- Controls (2 vials, 0.7 mL each, ready to use)

Negative control	REF DCE045/8201-0
Positive control	REF DCE045/8202-0
- 20X Conc. Streptavidin-peroxidase (1 vial, 0.7 mL)
REF DCE041/8241-0
- Streptavidin-peroxidase diluent (1 vial, 15 mL)
REF DCE048/8248-0
- GAD65 Biotin (3 vials, lyophilised)
REF DCE019/8219-0
- Biotin diluent (2 vials, 15 mL each)
REF DCE047/8247-0

7. Coated Microplate (1 breakable microplate)
Purified GAD adsorbed on the microplate
REF DCE002/8203-0
8. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (avoid any skin contact)
REF DCE004/8204-0
9. Stop Solution (1 vial, 12 mL)
Sulphuric acid 0.25M (avoid any skin contact)
REF DCE005/8205-0
10. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 125 mL)
REF DCE006/8206-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled or deionized water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Notes

Store all reagents between 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 7 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, Calibrators and Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN₃) or ProClin™ 300 as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

20X Conc. Streptavidin-peroxidase

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

P501 - Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection point, in accordance with local, regional, national and/or international regulation.

TMB Substrate

Reproductive toxicity, Category 1B



Danger

Hazard statements:

H360D - May damage the unborn child.

Precautionary statements:

P202 - Do not handle until all safety precautions have been read and understood.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P308+P313 - IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.

P501 - Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection point, in accordance with local, regional, national and/or international regulation.

Streptavidin-peroxidase diluent

Hazard statements:

EUH208 - May produce an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

N/A

- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.

- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.** For this purpose, Dia.Metra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.

- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Biotin

Prepare a sufficient amount of GAD65-Biotin solution by reconstitution of one vial lyophilized GAD65-Biotin with 5.5 mL diluent for GAD65-Biotin directly prior to use. The GAD65-Biotin solution can be store at 2-8°C for 3 days.

6.2. Preparation of the Wash Solution

Prepare a sufficient amount of washing solution by diluting the 10X Conc. Wash Solution 1:10 with distilled or deionized water. For example, dilute 50 mL of the Concentrate Wash with 450 mL of distilled water. The solution should be free of crystals before dilution, otherwise dissolve by warming up to max 37°C. The diluted washing solution can be stored at 2-8°C up to 30 days.

6.3. Preparation of the Streptavidin-peroxidase

Prepare a sufficient amount of Streptavidin-peroxidase solution by diluting the Streptavidin-peroxidase 20X Concentrate 1:20 with Streptavidin-peroxidase diluent (i.e 0.25 mL of Streptavidin-peroxidase concentrate with 4.75 mL of diluent). The solution prepared is stable up to 16 weeks at 2-8°C.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₁-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Sample		25 µL	
Calibrator C ₁ -C ₅	25 µL		
Controls		25 µL	
Cover the plate with a plastic film and incubate at room temperature (22-28°C) for 1 hour while shaking > 500 rpm. Remove the content from each well and wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.			
GAD65 Biotin	100 µL	100 µL	
Cover the plate with a plastic film and incubate at room temperature (22-28°C) for 1 hour while shaking > 500 rpm. Remove the contents from each well and wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Washing: follow the same indications of the previous point.			
Streptavidin peroxidase	100 µL	100 µL	
Cover the plate with a plastic film and incubate at room temperature (22-28°C) for 20 minutes while shaking > 500 rpm. Remove the contents from each well and wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Washing: follow the same indications of the previous point.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22-28°C) for 20 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. RESULTS

7.1. Calibration curve

The calibration curve is established by plotting the mean OD-values of the calibrators 1 - 5 on the ordinate, y-axis, versus their respective GAD65 Ab-concentrations on the abscissa, x-axis. In addition negative control (CI) should be used (see below). The GAD65 Abs concentrations of the controls and the unknown samples are directly read off in IU/ml from the measured OD450 values.

The anti-GAD kit may be used also with Computer Assisted Analysis using software able to curves with spline smoothing fit.

Example:

Sample	OD (a) 450 nm	OD (b) 450 nm	OD (mean)	IU/mL
Control CI	0.145	0.121	0.133	1
Calibrator 1	0.244	0.283	0.264	5
Calibrator 2	0.351	0.391	0.371	18
Calibrator 3	0.684	0.740	0.712	35
Calibrator 4	1.765	1.868	1.817	120
Calibrator 5	3.397	3.702	3.550	250
Control CII	---	---	---	---
Patient 1	0.850	0.857	0.854	41.8

7.2. Reference Values

Anti GAD	
Negative	< 5.0 IU/mL
Positive	≥ 5.0 IU/mL

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

8. CHARACTERISTICS

8.1. Calibration

The Anti GAD kit is calibrated against the WHO reference preparation NIBSC 97/550 and concentrations of GAD65 Abs are therefore expressed in IU/mL.

8.2. Linearity

On the basis of the heterogeneous nature of the autoantibody population and in view of epitope specificity and affinity of the autoantibodies the theoretical values expected by dilution with GAD65 Abs free human serum do not correspond with the measured concentrations in some cases.

8.3. Specificity and Sensitivity

Using a cut-off of 5 IU/mL, Anti GAD kit shows a sensitivity of 88.6% and specificity of 92.3%, regarding patients with newly onset type 1 diabetes.

8.4. Detection Limits

The analytical sensitivity of Anti GAD kit was established to be 0.24 IU/mL.

8.5. Intra and inter-assay variations

8.5.1. Intra-Assay

Within run variation was determined by replicate 12 times four different sera with values in the range of calibration curve. The within assay variability is $\leq 7.6\%$

8.5.2. Inter-Assay

Between run variation was determined by replicate the measurements of one control serum with different lots of kits and/or different mix of lots of reagents. The between assay variability is $\leq 8.2\%$.

9. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Batstra M, Anstoot H, Herbrink P: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using β -cell autoantibodies. Clin Lab 2001; 47:497-507
2. Seissler J, Hatzigelaki E, Scherbaum WA: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001; 109 Suppl 2: S304-S316
3. Pozzilli P, Manfrini S, Monetini L: Biochemical markers of type 1 diabetes; clinical use. Scand J Clin Lab Invest 2001; 61:38-44
4. Schernthaner 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; Suppl 2: S94-S108
5. Winter WE, Harris N, Schatz D: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. Clinical Diabetes 2002; 20: 183-191



DCM082-6
Ed. 12/2023

Anti GAD

para análisis de rutina

Ensayo ELISA cuantitativo para la detección de autoanticuerpos circulantes contra antígenos GAD

IVD



LOT

Vease la etiqueta externa

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO082

USO PREVISTO

El kit Anti-GAD es un ensayo ELISA cuantitativo *in vitro* para la determinación de autoanticuerpos circulantes contra los antígenos GAD (glutamato-decarboxilasa) en el suero de individuos con alto riesgo de padecer diabetes y de pacientes diabéticos DMID.

El kit Anti GAD está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLINICA

La diabetes de tipo 1, o diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), está causada por la destrucción autoinmune crónica de las células pancreáticas beta productoras de insulina. Es probable que la enfermedad se desencadene como consecuencia de la exposición de individuos genéticamente predispuestos a factores ambientales. Se estima que la destrucción autoinmune de las células beta es totalmente asintomática hasta que se pierde entre el 80 y el 90 % de dichas células.

Este proceso puede comenzar a cualquier edad y en cualquier momento, y tardar años en completarse.

Durante la fase preclínica, este proceso autoinmune es denunciado por la presencia de autoanticuerpos circulantes contra los antígenos de las células pancreáticas beta.

Estos autoanticuerpos, tales como anti-glutamato decarboxilasa (GAD), anti-insulina (AAI), y anti-tirosina

fosfatasa ICA 512 (IA-2) aparecen años antes del desarrollo de la diabetes de tipo 1 y antes de que los síntomas clínicos se manifiesten.

Se han identificado dos isoformas de GAD, la enzima catalizadora de la conversión del glutamato en GABA, respectivamente con peso molecular 65.000 (GAD65) y 67.000 (GAD67). Si bien los autoanticuerpos GAD se encuentran tanto en la diabetes de tipo 1 como en el raro trastorno neurológico denominado "síndrome de persona rígida" (*stiff man*, SMS), el perfil de los autoanticuerpos GAD difiere entre una y otra enfermedad.

Los autoanticuerpos de los pacientes afectados de SMS reconocen una combinación de epítopes de GAD lineales y conformacionales, mientras que los autoanticuerpos GAD65 en los pacientes con diabetes de tipo 1 se dirigen principalmente contra epítopes conformacionales. Los autoanticuerpos GAD65 están

presentes en el 70-80% de los pacientes a quienes por primera vez se diagnostica diabetes de tipo 1.

La combinación de autoanticuerpos anti-GAD65 y anti-IA-2 es sumamente importante para la evaluación del riesgo de padecer diabetes de tipo 1 en niños y adolescentes.

Estos análisis combinados son más sensibles y predictivos que los ICA en los grupos de riesgo, por ejemplo los familiares de pacientes con diabetes de tipo 1.

Los autoanticuerpos GAD65 están presentes también en un subgrupo de adultos con diabetes de tipo 2.

Estos pacientes pueden presentar acentuada hiperglucemia y, tras una terapia con fármacos hipoglucemiantes que puede durar de algunos meses hasta años, pueden convertirse en insulino dependientes. Se estima que estos pacientes tienen una forma lenta y progresiva de diabetes de tipo 1, llamada diabetes latente o diabetes autoinmune latente del adulto (LADA).

La presencia de autoanticuerpos GAD65 en el suero de estos pacientes es un marcador sensible y específico de una futura dependencia de la insulina.

2. PRINCIPIO

Este ensayo utiliza la capacidad de los autoanticuerpos GAD65 de actuar de manera bivalente y de formar un puente entre la GAD65 inmovilizada y la GAD65 biotinilada en fase líquida. En la primera fase, los autoanticuerpos GAD65 presentes en la muestra se ligan a la GAD65 fijada en la microplaca. En la segunda fase, a este complejo se liga a su vez la GAD65 biotinilada, que resulta proporcional a la cantidad de autoanticuerpos GAD65 presentes en el suero del paciente. La GAD65 biotinilada no ligada se elimina mediante lavado.

La GAD65 biotinilada ligada se cuantifica agregando estreptavidina-peroxidasa y un sustrato cromogénico (TMB); sucesivamente, se lee la densidad óptica (DO) a 450 nm.

3. REACTIVOS, MATERIALES Y INSTRUMENTOS

3.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (5 frascos, 0.7 mL cada uno)
CAL1 **REF** DCE002/8207-0
CAL2 **REF** DCE002/8208-0
CAL3 **REF** DCE002/8209-0
CAL4 **REF** DCE002/8210-0
CAL5 **REF** DCE002/8211-0
2. Controles (2 frascos, 0,7 mL cada uno)
Control Negativo **REF** DCE045/8201-0
Control Positivo **REF** DCE045/8202-0
3. Estreptavidina-peroxidasa conc. 20X (1 frasco, 0.7 mL) **REF** DCE041/8241-0
4. Estreptavidina-peroxidasa diluent (1 frasco, 15 mL) **REF** DCE048/8248-0
5. GAD65 Biotina (3 frascos, liofilizados) **REF** DCE019/8219-0
6. Diluyente Biotina (2 frascos, 15 mL cada uno) **REF** DCE047/8247-0
7. Microplaca ricubierta (1 microplaca divisible)
Microplaca ricubierta con GAD **REF** DCE002/8203-0
8. Solución substrato (1 frasco, 15 mL) **REF** DCE004/8204-0
9. Solución de parada (1 frasco, 12 mL)
Ácido sulfúrico 0,25M **REF** DCE005/8205-0
10. Solución de lavado conc 10X (1 frasco, 125 mL) **REF** DCE006/8206-0

3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada o desionizada.

3.3. Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Nota

Conservar todos los reactivos a 2÷8°C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 7 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradores y de los controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-

VIH 1 y 2, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y lo control positivo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.

- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN₃) o ProClin™ 300 como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Estreptavidina-peroxidasa conc. 20X
Sensibilización cutánea, categoría 1



Atención

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/ los vapores/el aerosol.

P272 - Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.

P280 - Llevar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara/los oídos.

P302+P352 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

P501 - Eliminar el contenido/contenedor en un punto de recogida de residuos peligrosos o especiales, de acuerdo con la normativa local, regional, nacional y/o internacional.

Solución substrato

Toxicidad para la reproducción, categoría 1B



Peligro

Indicaciones de peligro:

H360D - Puede dañar al feto.

Consejos de prudencia:

P202 - No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.

P280 - Llevar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara/los oídos.

P308+P313 - EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

P501 - Eliminar el contenido/contenedor en un punto de recogida de residuos peligrosos o especiales, de acuerdo con la normativa local, regional, nacional y/o internacional.

Estreptavidina-peroxidasa diluent

Indicaciones de peligro:

EUH208 - Puede provocar una reacción alérgica.

Consejos de prudencia:

N/A

- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- **ATENCIÓN: se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa adecuadamente, podría**

contaminarse por agentes externos; se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad necesaria exacta de conjugando y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática,** se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la flúidica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteinización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; **este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso.** Para tal fin, Dia.Metra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.

- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de la biotina

Preparar una cantidad suficiente de solución reconstituyendo un vial de GAD65-biotina liofilizada con 5,5 mL del diluyente específico directamente antes del uso.

Esta solución puede conservarse 3 días a 2-8°C.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Preparar una cantidad suficiente de solución de lavado diluyendo el tampón concentrado en proporción de 1+9 con agua destilada o desionizada.

Por ejemplo, diluir 50 ml de solución concentrada en 450 mL de agua destilada. Antes de la dilución, la solución no debe presentar cristales; si fuera necesario, disolverlos calentando el producto hasta un máximo de 37°C. La solución diluida se conserva hasta 30 días a 2-8°C.

6.3. Preparación de la estreptavidina-peroxidasa

Preparar una cantidad suficiente de solución de estreptavidina-peroxidasa diluyendo el correspondiente concentrado en proporción de 1+19 (0,25 mL de concentrado de estreptavidina con 4,75 mL del respectivo diluyente). La solución preparada permanece estable hasta 16 semanas conservada a 2-8°C.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₁-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivos	Calibradores	Muestras/ Controles	Blanco
Muestras		25 µL	
Calibradores C ₁ -C ₅	25 µL		
Controles		25 µL	
Sellar la placa con la película plástica e incubar 1 hora a temperatura ambiente (22-28°C) agitando > 500 rpm. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.			
GAD65 Biotina	100 µL	100 µL	
Sellar la placa con la película plástica e incubar 1 hora a temperatura ambiente (22-28°C) agitando > 500 rpm. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Lavados: siga las mismas instrucciones del punto anterior.			

Estreptavidina peroxidasa	100 µL	100 µL	
Sellar la placa con la película plástica e incubar 20 minutos a temperatura ambiente (22-28°C) agitando > 500 rpm. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Lavados: siga las mismas instrucciones del punto anterior.			
Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Cubrir la placa e incubar 20 minutos a temperatura ambiente (22-28°C), protegida de la luz			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

7. RESULTADOS

7.1. Curva de calibración

La Curva de calibración se determina indicando la media de los valores de DO de los Calibradores 1-5 en el eje y de ordenadas, contra sus respectivas concentraciones de autoanticuerpos GAD65 en el eje x de abscisas. Además se debe utilizar el control negativo (CI) (ver abajo).

La concentración de autoanticuerpos GAD65 de los controles y las muestras desconocidas se calcula directamente en IU/mL a partir de los valores de DO medidos a 450 nm indicados en la Curva de calibración.

El kit anti-GAD puede utilizarse también para análisis computarizados, con un software que utilice un mecanismo de alisado por splines.

Ejemplo:

Muestra	DO (a) 450 nm	DO (b) 450 nm	DO (media)	IU/mL
Control CI	0.145	0.121	0.133	1
Calibrador 1	0.244	0.283	0.264	5
Calibrador 2	0.351	0.391	0.371	18
Calibrador 3	0.684	0.740	0.712	35
Calibrador 4	1.765	1.868	1.817	120
Calibrador 5	3.397	3.702	3.550	250
Control CII	---	---	---	---
Paciente 1	0.850	0.857	0.854	41.8

7.2. Valores de referencia

Anti GAD	
negativo	< 5.0 IU/mL
positivo	≥ 5.0 IU/mL

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para

una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

8. CARACTERÍSTICAS

8.1. Calibración

El kit anti-GAD se calibró contra el preparado de referencia OMS NIBSC 97/550; por esta razón, las concentraciones de anticuerpos GAD65 se expresan en IU/mL.

8.2. Linealidad

A causa de la naturaleza heterogénea de la población de autoanticuerpos y vista su especificidad epitópica y su afinidad, los valores teóricos esperados para las diluciones de anticuerpos GAD65 podrían no corresponder, en algunos casos, a la concentración registrada durante un análisis de recuperación.

8.3. Especificidad y sensibilidad

Using a cut-off of 5 IU/mL, the anti-GAD kit has 88.6% sensitivity and 92.3% specificity, for patients with a newly onset type 1 diabetes.

8.4. Límites de detección

La sensibilidad analítica se establece en 0,24 IU/mL.

8.5. Variación intra y entre ensayos

8.5.1. Intra-Assay

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (12x) cuatro niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es $\leq 7.6\%$.

8.5.2. Inter-Assay

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo tres niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es $\leq 8.2\%$.

9. ELIMINACIÓN DE RESIDUO

Los reactivos deben desecharse de acuerdo con las normativas locales.

- Pozzilli P, Manfrini S, Monetini L: Biochemical markers of type 1 diabetes; clinical use. Scand J Clin Lab Invest 2001;61:38-44
- Schernthaner 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; Suppl 2: S94-S108
- Winter WE, Harris N; Schatz D: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. Clinical Diabetes 2002; 20: 183-191

Ed. 12/2023

DCM082-6

BIBLIOGRAFÍA

- Batstra M, Anstoot H, Herbrink P: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using β -cell autoantibodies. Clin Lab 2001; 47:497-507
- Seissler J, Hatziagelaki E, Scherbaum WA: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001; 109 Suppl 2: S304-S316

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs