



## Anti-GAD

pour analyses de routine

Test ELISA quantitatif pour la détermination des auto-anticorps circulants contre les antigènes GAD.

IVD



LOT

Voir étiquette externe

2°C  8°C



$\Sigma = 96$  déterminations

REF 39595

### UTILISATION PREVUE

Le coffret ELISA Anti-GAD est un test pour la détermination quantitative in vitro des auto-anticorps circulants contre les antigènes GAD (acide glutamique décarboxylase) chez les sujets prédiabétiques à haut risque et chez les patients diabétiques IDDM.

### 1. SIGNIFICATION CLINIQUE

Le diabète de type 1, aussi connu comme mellitus insulino-dépendant (IDDM), est caractérisé par la destruction auto-immunitaire chronique des cellules bêta qui sécrètent l'insuline. Cette pathogenèse est probablement due à l'exposition de sujets génétiquement susceptibles à des agents environnementaux. On pense que la destruction auto-immunitaire des cellules bêta pancréatiques est complètement asymptomatique jusqu'à la perte de 80-90% des cellules. Ce processus peut commencer à tout âge et peut durer des années avant d'être complètement achevé. Durant la phase préclinique, ce processus auto-immunitaire peut être mis en évidence par la présence d'auto-anticorps circulants contre les antigènes des cellules pancréatiques bêta. Ces auto-anticorps tels que l'anti-acide glutamique décarboxylase (GAD), l'anti-insuline (IAA), et l'anti-tyrosine phosphatase ICA 512 (IA2) apparaissent des années avant le développement du diabète de type 1 et avant l'apparition des symptômes cliniques. La GAD, l'enzyme qui catalyse la conversion du glutamate en GABA, a été identifiée sous deux isoformes, avec des poids moléculaires de 65.000 (GAD65) et de 67.000 (GAD67). Bien que les anticorps GAD se trouvent tant dans le diabète de type 1 que dans le désordre neurologique rare appelé syndrome de Stiff-man (SMS), le profil des auto-anticorps GAD diffère dans les deux maladies.

Les auto-anticorps des patients SMS reconnaissent une combinaison des épitopes GAD linéaire et de conformation tandis que les auto-anticorps GAD65 chez les patients avec diabète de type 1 sont principalement dirigés contre les épitopes de conformation. Les auto-anticorps GAD 65 (GAD 65 Ac) se trouvent chez 70-80% des patients avec diagnostic récent de diabète de type 1.

La combinaison des auto-anticorps contre GAD65 et IA2 est très importante pour l'évaluation du risque de diabète de type 1 chez les enfants et les adolescents. La combinaison de ces tests est plus sensible et prédictive que les ICA dans les groupes à risque, comme par exemple les parents des patients avec diabète de type 1.

Les auto-anticorps GAD65 sont aussi présents dans les sous-groupes d'adultes avec un diabète de type 2. Ces patients peuvent avoir des hyperglycémies, et après une thérapie avec des agents hypoglycémisants qui varie de quelques mois à des années, ils peuvent devenir

insulino-dépendants. On pense que ces patients ont une forme lente et progressive de diabète de type 1, souvent appelée diabète latent ou diabète auto-immunitaire latent des adultes (LADA).

La présence des auto-anticorps GAD65 dans le sérum de ces patients est un marqueur sensible et spécifique pour la future dépendance à l'insuline.

### 2. PRINCIPE DE LA METHODE

Le test utilise la capacité des auto-anticorps GAD65 à agir de façon bivalente et à former un pont entre la GAD immobilisée sur la plaque et la biotine-GAD65 en phase liquide. Dans la première phase, les auto-anticorps des échantillons se fixent à la GAD65 immobilisée dans les micropuits. Dans la deuxième phase, la Biotine-GAD65 se fixe à son tour à ce complexe. La Biotine-GAD65 fixée est proportionnelle à la quantité d'auto-anticorps GAD65 dans le sérum du patient. La biotine-GAD65 non fixée est éliminée par lavage. La biotine-GAD65 fixée peut être quantifiée par ajout de Streptavidine-peroxydase et d'un substrat chromogénique (TMB) avec lecture successive de la densité optique (DO) à 450 nm.

### 3. REACTIFS, MATERIELS ET EQUIPEMENT

#### 3.1. Réactifs et matériels fournis dans le kit

1. Standards anti-GAD 5x (1 flacon = 0,7 mL)

STD1	REF DCE002/8207-0
STD2	REF DCE002/8208-0
STD3	REF DCE002/8209-0
STD4	REF DCE002/8210-0
STD5	REF DCE002/8211-0

2. Contrôles (2 x 0,7 mL)

Contrôle négatif GAD	REF DCE045/8201-0
Contrôle positif GAD	REF DCE045/8202-0

3. Streptavidine-perox (0,7 mL)

REF DCE002/8202-S

4. Diluant strept-perox (1 flacon) 15 mL

REF DCE009/8209-S

5. Biotine GAD65 (3 flacons lyophilisés)

REF DCE002/8202-0

6. Diluant biotine (2 flacons) 15 mL

REF DCE009/8209-0

7. Microplaque recouverte

(1 microplaque fractionnable)

Microplaque recouverte de GAD REF DCE002/8203-0

8. Solution substrat (1 flacon) 15 mL

REF DCE004/8204-0

9. Solution d'arrêt (1 flacon) 12 mL

Acide sulfurique 0,25M REF DCE005/8205-0

10. Solution lavage conc. 10X (1 flacon) 125 mL  
**REF DCE006/8206-0**

**3.2. Réactifs nécessaires non fournis dans le kit**  
 Eau distillée ou désionisée.

**3.3. Matériel et équipement auxiliaire**  
 Distributeurs automatiques.  
 Lecteur pour microplaques (450 nm).

#### 4. PRECAUTIONS

- Ce kit est uniquement pour le diagnostic in vitro.
- Suivre attentivement les instructions.
- Respecter la date d'échéance présente sur l'étiquette.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Ne pas utiliser de réactifs d'autres fournisseurs.
- Il est important que le temps de réaction de chaque puit soit le même pour la reproductibilité des résultats
- Tous les réactifs doivent être conservés dans le récipient d'origine entre 2-8°C avant l'utilisation.
- Les réactifs 1, 2 et 10 contiennent de petites quantités (< 0.1 % p/p) d'azide de sodium comme conservateur. Eviter le contact avec la peau ou les muqueuses.
- Les matériels d'origine humaine utilisés pour la préparation de ce kit ont été analysés et sont non réactifs HIV 1 et 2 et aux anticorps HCV et Hbs Ag, mais doivent quand même être traités comme potentiellement infectés.
- Dans tous les cas, toutes les règles relatives à la protection générale et individuelle pour l'utilisation de ce kit doivent être appliquées.

#### 5. PROCEDURE

##### 5.1. Préparation de la Biotine

Préparer une quantité suffisante de solution biotine GAD65 en reconstituant un flacon de biotine lyophilisée avec 5,5 ml de diluant pour la biotine GAD65 juste avant l'usage. Cette solution peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant 3 jours.

##### 5.2. Préparation de la Solution de lavage

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

##### 5.3. Préparation de la streptavidine peroxydase

Préparer une quantité suffisante de solution de Streptavidine-peroxydase en diluant le concentré de streptavidine-perox 1+19 (0,25 ml strept concentrée avec 4,75 ml diluant pour strept-perox). La solution préparée est stable jusqu'à 16 semaines à 2 - 8 °C.

##### 5.4. Procédure

Le kit contient une microplaque avec 8x12 puits recouverts d'antigène GAD purifié. Le nombre de barrettes utilisées dans chaque essai dépend du nombre d'échantillons à analyser. Si on utilise toutes les 12 barrettes, ce test permet d'analyser un total de 40 échantillons de sérum dupliqué.  
**NOTE IMPORTANTE:** Porter tous les réactifs, y compris les sérums, à température ambiante (18-25°C) avant l'analyse.

Standard S1-S5	25 µL		
Contrôles	25 µL		
Sceller la microplaque avec la pellicule de plastique et incubé pendant 1 heure à température ambiante (18 - 25°C) en agitant à > 500 tpm. Enlever le mélange de réaction, laver en ajoutant dans chaque puit 0,3 mL de solution de lavage diluée; répéter le lavage deux fois en éliminant complètement la solution.			
Biotine GAD65	100 µL	100 µL	
Sceller la microplaque avec la pellicule de plastique et incubé pendant 1 heure à température ambiante (18 - 25°C) en agitant à > 500 tpm. Enlever le mélange de réaction, laver en ajoutant dans chaque puit 0,3 mL de solution de lavage diluée; répéter le lavage deux fois en éliminant complètement la solution.			
Strept perox	100 µL	100 µL	
Sceller la microplaque avec la pellicule de plastique et incubé pendant 20 minutes à température ambiante (18 - 25°C) en agitant > 500tpm. Eloigner le mélange de réaction, laver en ajoutant dans chaque puit 0,3 mL de solution de lavage diluée; répéter le lavage deux fois en éliminant complètement la solution.			
Substrat	100 µL	100 µL	100 µL
Recouvrir la plaque et la laisser incubé 20 minutes dans l'obscurité à température ambiante (18 - 25°C).			
Solution d'arrêt	100 µL	100 µL	100 µL
Lire l'absorbance (E) à 450 nm en mettant à zéro avec le Blanc dans les 5 min après l'ajout de la solution d'arrêt.			

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

#### 6. RESULTATS

##### 6.1. Courbe standard

La courbe standard est établie en traçant les valeurs moyennes des DO des standard 1-5 sur l'axe des ordonnées (axe y) contre les concentrations respectives des Ac GAD65 sur l'axe des abscisses (axe x). Il est de plus recommandé d'utiliser le contrôle négatif (voir ci-dessous). La concentration des anticorps GAD65, des contrôles et des échantillons inconnus est lue directement en IU/ml en reportant la valeur de la DO à 450 nm sur la courbe standard.

Le kit anti-GAD peut aussi être utilisé avec Computer Assisted Analysis en utilisant un logiciel capable de tracer des courbes avec spline smoothing fit.

Exemple:

Réactifs	Standard	Echantillons	Blanc
Echantillons		25 µL	

Echantillon	DO (a) 450 nm	DO (b) 450 nm	DO (moyenn e)	IU / ml
Contrôle CI	0.145	0.121	0.133	1
Standard 1	0.244	0.283	0.264	5

Standard 2	0.351	0.391	0.371	15
Standard 3	0.684	0.740	0.712	35
Standard 4	1.765	1.868	1.817	100
Standard 5	3.397	3.702	3.550	250
Contrôle CII	---	---	---	---
Patient 1	0.850	0.857	0.854	41.8

## 6.2. Valeurs de Référence

anti-GAD	
négatif	< 5.0 IU/ml
positif	≥ 5.0 IU/ml

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres plages de références normales et pathologiques pour les niveaux d'anticorps anti-GAD65 dans le sérum. Donc, les valeurs reportées ci-dessus doivent être considérées uniquement comme indication.

## 7. CARACTERISTIQUES DE LA PROCEDURE

### 7.1. Calibration

Le kit anti-GAD est calibré par rapport aux préparations de référence WHO NIBSC 97/550, les concentrations d'anticorps GAD65 sont donc exprimées en IU/mL.

### 7.2. Linéarité

En considérant la nature hétérogène de la population des anticorps, leur spécificité et affinité, les valeurs théoriques attendues pour les dilutions des anticorps GAD65, pourraient dans certains cas ne pas correspondre à la concentration mesurée au cours d'un test de récupération.

### 7.3. Spécificité et Sensibilité

En utilisant un cut-off de 5 IU/ml, le kit anti-GAD a une sensibilité de 92,3 % et une spécificité de 98,6 %, chez les patients avec développement récent de diabète de type 1.

### 7.4. Limites de détection

La sensibilité analytique (plus faible concentration détectable,  $0 \pm 3$  DS) est établie à 0,8 IU/ml.

La sensibilité fonctionnelle est mesurée comme 20 % du CV inter-tests à 4 IU/ml.

### 7.5. Variation intra et inter-tests

Intra-test			Inter-tests		
N° Echantillon	Conc moyenne (IU/ml)	CV (%)	N° Echantillon	Conc. moyenne (IU/ml)	CV (%)
1	16	4	5	5	14
2	60	4	6	42	7
3	151	4	7	99	3
4	256	3	8	237	25

## 8. DISPOSITIONS POUR L'ELIMINATION

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

## BIBLIOGRAPHIE

- Batstra M, Anstoot H, Herbrink P: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using  $\beta$ -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: S304-S316
- 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

## SUGGESTIONS POUR LA RESOLUTION DES PROBLEMES /TROUBLESHOOTING

### ERREURS CAUSES POSSIBLES/SUGGESTIONS

#### Aucune réaction colorimétrique de l'échantillon

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

#### Réaction trop faible (DO trop basses)

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

#### Réaction trop intense (DO trop hautes)

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

- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (faible degré de déionisation)

- lavages insuffisants (conjugué non complètement enlevé)

#### Valeurs inexplicables hors échelle

- contamination de pipette, embouts ou récipients- lavages insuffisants (conjugué pas complètement enlevé)

CV% intra-test élevé

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

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

CV% inter-test élevé

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

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

- variabilité intrinsèque des opérateurs

Ed. 10/2009

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

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



**Manufacturer:**  
**DiaMetra S.r.l. Headquarter:**  
Via Garibaldi, 18  
20090 SEGRATE (MI)  
Tel. 0039-02-2139184 - 02-26921595  
Fax 0039-02-2133354.

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

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

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

**EL**  
**Διανέμεται στην**  
**ΕΛΛΑΔΑ από την**  
A. Menarini Diagnostics S.A.  
575, Vouliagmenis Ave.  
16451 Argroupolis  
Attiki

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

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

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

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