



Instructions for Use

GAD₆₅ Autoantibody ELISA



EIA-4087



96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

***Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
Por favor, usar a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.***

Table of Contents / Tabella dei Contenuti

1	INTENDED USE.....	2
2	REFERENCES / LITERATURE.....	2
3	ASSAY PRINCIPLE	2
4	STORAGE AND PREPARATION OF TEST SERUM SAMPLES.....	3
5	MATERIALS REQUIRED AND NOT SUPPLIED	3
6	PREPARATION OF REAGENTS SUPPLIED	3
7	ASSAY PROCEDURE	4
8	RESULT ANALYSIS.....	4
9	ASSAY CUT OFF.....	5
10	CLINICAL EVALUATION	5
11	SAFETY CONSIDERATIONS	6
12	ASSAY PLAN.....	7
1	APPLICABILITÀ	8
2	BIBLIOGRAFIA	8
3	PRINCIPIO DEL TEST	8
4	CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI SIERO.....	8
5	MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO	9
6	PREPARAZIONE DEI REAGENTI FORNITI.....	9
7	PROCEDIMENTO D'ANALISI	9
8	ANALISI DEI RISULTATI	10
9	VALORE SOGLIA DEL TEST	11
10	VALUTAZIONE CLINICA	11
11	CONSIDERAZIONI DI SICUREZZA.....	12
12	SCHEMA DEL SAGGIO.....	13
	SYMBOLS USED.....	14

1 INTENDED USE

The GAD₆₅ Autoantibody (GAD Ab) ELISA kit is intended for use by professional persons only, for the quantitative determination of GAD Ab in human serum.

Autoantibodies to pancreatic beta cell antigens are important serological markers of type 1 diabetes mellitus (type 1 DM). The antigens recognised by these antibodies include insulin, glutamic acid decarboxylase (GAD₆₅ kDa isoform), the islet cell antigen IA-2 or ICA-512 and zinc transporter 8 (ZnT8).

2 REFERENCES / LITERATURE

H. Brooking et al

A Sensitive non-isotopic assay for GAD₆₅ autoantibodies Clinica Chimica Acta 2000 331:55-59

S. Chen et al Sensitive non isotopic assays for autoantibodies to IA2 and to a combination of both IA2 and GAD₆₅. Clinica Chimica Acta 2005 357:74-83

E. Nilson et al

Calcium addition to EDTA plasma eliminates falsely positive results in the RSR GADAb ELISA.

Clinica Chimica Acta 388 (2008) 130-134

K. Rahmati et al

A Comparison of Serum and EDTA Plasma in the Measurement of Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodies (GADA) and Autoantibodies to Islet Antigen-2 (IA-2A) Using the RSR Radioimmunoassay (RIA) and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kits. Clin. Lab. 2008 54:227-235

C.Törn et al

Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. Diabetologia 2008 51:846-852

Patents

The following patents apply:

US patents US 8,129,132 B2 and US 10,481,156 B2.

3 ASSAY PRINCIPLE

In the GAD Ab ELISA, GAD Ab in patients' sera, calibrators and controls are allowed to interact with GAD₆₅ coated onto ELISA plate wells.

After a 1 hour incubation, the samples are discarded leaving GAD Ab bound to the immobilised GAD₆₅ on the plate. GAD₆₅ Biotin is added in a 2nd incubation step where, through the ability of GAD Ab in the samples to act divalently, a bridge is formed between GAD₆₅ immobilised on the plate and GAD₆₅ Biotin.

The amount of GAD₆₅ Biotin bound is then determined in a 3rd incubation step by addition of Streptavidin Peroxidase, which binds specifically to Biotin. Excess, unbound Streptavidin Peroxidase is then washed away and addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) results in formation of a blue colour. This reaction is stopped by addition of stop solution causing the well contents to turn yellow.

The absorbance of the yellow reaction mixture at 450 nm and 405 nm is then read using an ELISA plate reader.

A higher absorbance indicates the presence of GAD Ab in the test sample. Reading at 405 nm allows quantitation of high absorbances (and should be used for concentrations of 120 U/mL or more).

Low values (less than 10 U/mL) should be read off the 450 nm calibration curve. If it is possible to read at only one wavelength 405 nm may be used.

The measuring interval is 5 – 2000 U/mL (units are NIBSC 97/550).

4 STORAGE AND PREPARATION OF TEST SERUM SAMPLES

Sera to be analysed should be assayed soon after separation or stored, preferably in aliquots, at or below -20 °C. 50 µL is sufficient for one assay (duplicate 25 µL determinations).

Repeated freeze thawing or increases in storage temperature should be avoided.

Do not use lipaemic or haemolysed serum samples.

Do not use plasma in the assay.

When required, bring test sera to room temperature and mix gently to ensure homogeneity. Centrifuge serum prior to assay (preferably for 5 min at 10-15,000 rpm in a microfuge) to remove particulate matter. Please do not omit this centrifugation step if sera are cloudy or contain particulates.

5 MATERIALS REQUIRED AND NOT SUPPLIED

- Pipettes capable of dispensing 25 µL and 100 µL.
- Means of measuring out various volumes to reconstitute or dilute reagents.
- Pure water.
- ELISA plate reader suitable for 96 well formats and capable of measuring at 450 nm and 405 nm.
- ELISA Plate shaker, capable of 500 shakes/min (not an orbital shaker).
- ELISA Plate cover

6 PREPARATION OF REAGENTS SUPPLIED

Store unopened kit and components at 2 °C - 8 °C.

A	GAD₆₅ coated wells 12 breakapart strips of 8 wells (96 in total) in a frame and sealed in a foil bag. Allow to stand at room temperature (20 °C - 25 °C) for at least 30 minutes before opening. Ensure wells are firmly fitted into frame provided. After opening return any unused wells to the original foil bag and seal with adhesive tape. Place foil bag in the self-seal plastic bag with desiccant provided, and store at 2 °C - 8 °C for up to 16 weeks.
B1-6	Calibrators 5, 18, 35, 120, 250, 2000 U/mL (units are NIBSC 97/550) 6 x 0.7 mL; Ready to use
C	Positive control [CONTROL +] (see label for concentration range) 0.7 mL Ready to use
D	Negative control [CONTROL -] 0.7 mL Ready to use
E	GAD₆₅-Biotin 3 vials Lyophilised Reconstitute each vial with 5.5 mL GAD Biotin reconstitution buffer (F). When more than one vial is used, pool the vials and mix gently before use. Store at 2 °C - 8 °C for up to 3 days after reconstitution.
F	Reconstitution Buffer for GAD-Biotin 2 x 15 mL, coloured red Ready to use
G	Streptavidin Peroxidase (SA-POD) 1 x 0.7 mL Concentrated <u>Dilute</u> 1 in 20 with diluent for diluting SA-POD (H). For example, 0.5 mL (G) + 9.5 mL (H). Store at 2 °C - 8 °C for up to 16 weeks after dilution.
H	Diluent for diluting SA-POD 15 mL Ready to use
I	Peroxidase Substrate (TMB) 15 mL Ready to use
J	Concentrated Wash Solution 125 mL Concentrated <u>Dilute</u> 10 X with pure water before use. Store at 2 °C - 8 °C up to kit expiry date.
K	Stop Solution 12 mL Ready to use

7 ASSAY PROCEDURE

Allow all reagents to stand at room temperature (20 °C - 25 °C) for at least 30 minutes before use. A repeating Eppendorf type pipette is recommended for steps 4, 7, 10 and 11.

1. Pipette **25 µL** of patient sera, Calibrators (B1-6) and controls (C and D) into respective wells (in duplicate is recommended), leaving one well empty for blank (see step 12)
2. Cover the frame and shake the wells for 1 hour at room temperature on an ELISA plate shaker (500 shakes per min).
3. Use an ELISA plate washer to aspirate and wash the wells three times with diluted wash solution (J). If a plate washer is not available, discard the well contents by briskly inverting the frame of wells over a suitable receptacle, wash three times manually and finally tap the inverted wells gently on a clean dry absorbent surface.
4. Pipette **100 µL** of reconstituted GAD₆₅-Biotin (E) into each well (except blank). Avoid splashing the material out of the wells during addition.
5. Cover the frame and incubate at room temperature for 1 hour on an ELISA plate shaker (500 shakes per min).
6. Repeat wash step 3.
7. Pipette **100 µL** of diluted SA-POD (G) into each well (except blank).
8. Cover the frame and incubate at room temperature for 20 minutes on an ELISA plate shaker (500 shakes per min).
9. Repeat wash step 3. If manual washing is being carried out use one additional wash step with pure water (to remove any foam) before finally tapping the inverted wells dry.
10. Pipette **100 µL** of TMB (I) into each well (including blank) and incubate in the dark at room temperature for 20 minutes without shaking.
11. Pipette **100 µL** stop solution (K) to each well (including blank) cover the plate and shake for approximately 5 seconds on a plate shaker. Ensure substrate incubations are the same for each well.
12. Within 15 minutes, read the absorbance of each well at 450 nm and 405 nm using an ELISA plate reader, blanked against a well containing 100 µL of TMB (I) and 100 µL Stop solution (K) only.

8 RESULT ANALYSIS

A calibration curve can be established by plotting calibrator concentration on the x-axis (log scale) against the absorbance of the calibrators on the y-axis (linear scale). The GAD Ab concentrations in patients' sera can then be read off the calibration curve [plotted at DRG as a spline log/lin curve (smoothing factor = 0)].

Other data reduction systems can be used.

The negative control can be assigned a value of 0.5 U/mL to assist in computer processing of assay results.

Most test sera will have values below 250 U/mL and the 2000 U/mL calibrator need not always be included.

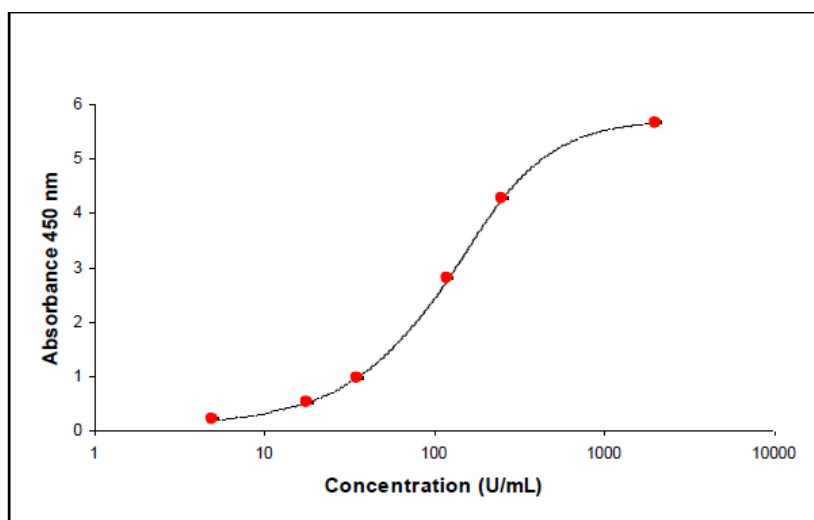
Samples with high GAD Ab concentrations can be diluted in GAD Ab negative serum or the kit negative control (D).

For example, 20 µL of sample plus 180 µL of diluent to give a 10x dilution. Other dilutions (e.g. 100x) can be prepared from a 10x dilution or otherwise as appropriate. Some sera will not dilute in a linear way according to the kit calibrators (standardised against NIBSC 97/550).

TYPICAL RESULTS (Example only, not for calculation of actual results)

Calibrator	A 450 nm	Conc. U/mL	A 405 nm	Conc. U/mL
B1	0.199	5	0.061	5
B2	0.527	18	0.164	18
B3	0.975	35	0.301	35
B4	2.794	120	0.843	120
B5	4.264	250	1.254	250
B6	5.671	2000	1.668	2000
Negative Control (D)	0.035	0	0.012	0
Positive Control (C)	1.374	49.2	0.418	49.6

Absorbance readings at 405 nm can be converted to 450 nm absorbance values by multiplying by the appropriate factor (3.4 in the case of equipment used at DRG).



9 ASSAY CUT OFF

Cut off **U/mL**

Negative < 5 U/mL

Positive ≥ 5 U/mL

This cut off has been validated at DRG. However each laboratory should establish its own normal and pathological reference ranges for GAD Ab levels. Also it is recommended that each laboratory include its own panel of control samples in the assay.

10 CLINICAL EVALUATION

10.1 Clinical Specificity and Sensitivity

In the DASP 2005 study the GAD Ab ELISA kit achieved 98% (n=100) specificity and 92% (n=50) sensitivity.

10.2 Lower Detection Limit

The kit negative control was assayed 20 times and the mean and standard deviation calculated.

The lower detection limit at +2 standard deviations was 0.57 U/mL.

10.3 Inter Assay Precision

Sample	U/mL (n=20)	CV (%)
A	97	5.7
B	21	5.2
C	5.7	6.4

10.4 Intra Assay Precision

Sample	U/mL (n=25)	CV (%)
1	97	7.3
2	20	8.5
3	7.0	3.5

10.5 Clinical Accuracy

Analysis of sera from patients with autoimmune diseases other than type 1 DM disease indicated no interference from autoantibodies to thyroglobulin or thyroid peroxidase (n = 10) or TSH receptor (n = 20).

One sample positive for dsDNA (n = 10) and one sample positive for rheumatoid factor (n = 30) were positive for GAD Ab.

10.6 Interference

No interference was observed when samples were spiked with the following materials; haemoglobin up to 5 mg/mL, bilirubin up to 20 mg/dL or intralipid up to 3000 mg/dL.

11 SAFETY CONSIDERATIONS

Streptavidin Peroxidase (SA-POD)

Signal word: Warning



Hazard statement(s)

H317: May cause an allergic skin reaction

Precautionary statement(s)

P261: Avoid breathing mist, vapours

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

P280: Wear protective gloves/protective clothing/ eye protection/face 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

Peroxidase Substrate (TMB)

Signal word: Danger



Hazard statement(s)

H360D: May damage the unborn child

Precautionary statement(s)

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

P280: Wear protective gloves/protective clothing/ eye protection/face 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

Diluent for SA-POD

Hazard statement(s)

EUH208: Contains 2-Chloroacetamide. May produce an allergic reaction.

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only.
- Follow the instructions carefully.
- Observe expiry dates stated on the labels and the specified shelf life stability for coated wells, reconstituted and diluted reagents.
- Refer to Safety Data Sheet for more detailed safety information.
- Material of human origin used in the preparation of the kit has been tested and found non reactive for HIV1 and 2 and HCV antibodies and HBsAg but should, none the less, be handled as potentially infectious. Wash hands thoroughly if contamination has occurred and before leaving the laboratory.
- Sterilise all potentially contaminated waste, including test specimens before disposal.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy but should be handled as potentially infectious. Some components contain small quantities of sodium azide as preservative.
- As with all kit components, avoid ingestion, inhalation, injection or contact with skin, eyes and clothing.
- Avoid formation of heavy metal azides in the drainage system by flushing any kit components away with copious amounts of water.

12 ASSAY PLAN

Allow all reagents and samples to reach room temperature (20 °C – 25 °C) before use	
Pipette:	25 µL calibrators (B1-6), controls (C and D) and patient sera (except blank)
Incubate:	1 hour at room temperature on an ELISA plate shaker at 500 shakes/min
Aspirate/Decant:	ELISA plate (A)
Wash:	ELISA plate (A) three times and tap dry on absorbent material ¹
Pipette:	100 µL GAD ₆₅ -Biotin (E) (reconstituted) into each well (except blank).
Incubate:	1 hour at room temperature on an ELISA plate shaker at 500 shakes/min
Aspirate/Decant:	ELISA plate (A)
Wash:	ELISA plate (A) three times and tap dry on absorbent material ¹
Pipette:	100 µL SA-POD (G) (diluted 1:20) into each well (except blank).
Incubate:	20 minutes at room temperature on an ELISA plate shaker at 500 shakes/min
Aspirate/Decant:	ELISA plate (A)
Wash:	ELISA plate (A) three times, rinse with pure water and tap dry on absorbent material ¹
Pipette:	100 µL TMB (I) into each well (including blank)
Incubate:	20 minutes at room temperature in the dark (without shaking)
Pipette:	100 µL stop solution (K) into each (including blank) well and shake for 5 seconds
Read absorbance at 450 nm and 405 nm, <u>within 15 minutes</u> of adding stop solution	
¹ It is not necessary to tap dry the plates after washing when an automatic plate washer is used. The pure water wash can be omitted when using an automatic washer.	

1 APPLICABILITÀ

Il test ELISA GAD₆₅ autoanticorpi (GAD Ab) è stato sviluppato per l'uso da parte di operatori specializzati per la determinazione quantitativa di autoanticorpi GAD nel siero umano.

Autoanticorpi ad antigeni per cellule beta pancreatiche sono marker sierologici importanti del tipo I di diabetes mellitus (tipo 1 DM). Gli antigeni riconosciuti da questi anticorpi includono l'insulina, la acido glutammico decarbossilasi (GAD₆₅ kDa isoforma), un antigene di cellule dell'islotto IA-2 o ICA-512 e il trasportatore dello zinco 8 (ZnT8).

2 BIBLIOGRAFIA

H. Brooking et al

A Sensitive non-isotopic assay for GAD₆₅ autoantibodies Clinica Chimica Acta 2000 331:55-59

S. Chen et al Sensitive non isotopic assays for autoantibodies to IA2 and to a combination of both IA2 and GAD₆₅. Clinica Chimica Acta 2005 357:74-83

E. Nilson et al

Calcium addition to EDTA plasma eliminates falsely positive results in the RSR GADAb ELISA. Clinica Chimica Acta 388 (2008) 130-134

K. Rahmati et al

A Comparison of Serum and EDTA Plasma in the Measurement of Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodies (GADA) and Autoantibodies to Islet Antigen-2 (IA-2A) Using the RSR Radioimmunoassay (RIA) and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kits. Clin. Lab. 2008 54:227-235

C.Törn et al

Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. Diabetologia 2008 51:846-852

Brevetti

Si applicano i seguenti brevetti:

US patents US 8,129,132 B2 and US 10,481,156 B2.

3 PRINCIPIO DEL TEST

Nel test ELISA GAD Ab, gli autoanticorpi GAD nel siero di pazienti, i calibratori e i controlli sono portati ad interagire con GAD₆₅ immobilizzata sui pozzetti ELISA.

Dopo 1 ora di incubazione i campioni vengono rimossi lasciando gli autoanticorpi GAD legati alla GAD₆₅ immobilizzata. GAD₆₅-biotina è aggiunta in un secondo passaggio d'incubazione dove, grazie alla abilità degli autoanticorpi GAD dei campioni di agire in modo bivalente, si forma un ponte tra GAD₆₅ immobilizzata su piastra e GAD₆₅-biotina.

La quantità di GAD₆₅-biotina legata viene poi determinata in un terzo passaggio d'incubazione aggiungendo la perossidasi di streptavidina, che lega specificamente alla biotina. L'eccesso di perossidasi di streptavidina non legata è lavata via e l'aggiunta di 3'3'5'5' – benzidine tetrametilico (TMB) risulta nella formazione di un colore blu. Questa reazione è fermata dall'aggiunta di una soluzione d'arresto causando un viraggio al giallo.

L'assorbanza di questa miscela di reazione gialla a 450 nm e 405 nm è poi determinata tramite uno spettrofotometro per piastre. Una assorbanza maggiore indica la presenza di autoanticorpi GAD nel campione. La lettura a 405 nm permette la quantificazione di assorbanze molto alte (e dovrebbe essere usata per concentrazioni uguali o superiori a 120 U/mL). Valori bassi (meno di 10 U/mL) dovrebbero essere determinati a 450 nm dalla curva di calibrazione. Se la lettura ad una lunghezza d'onda soltanto è possibile, si raccomanda 405 nm.

Il intervallo di misurazione è 5 – 2000 U/mL (standardizzati contro NIBSC 97/550).

4 CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI SIERO

I sieri da analizzare devono essere usati poco dopo la raccolta o conservati, in aliquoti preferibilmente, a -20 °C o sotto. 50 µL sono sufficienti per un test (determinazione in doppio, 25 µL ciascuna).

Ripetuti cicli di congelamento e scongelamento devono essere evitati.

Non usare campioni lipemici o emolitici.

Non usare plasma nel dosaggio.

Se richiesto, scongelare i sieri e portarli a temperatura ambiente e agitarli per ottenere l'omogeneità. Centrifugare sieri prima del test (preferibilmente per 5 min a 10-15000 g in una microcentrifuga) per rimuovere materiale particolato. Si prega di non omettere questo passaggio di centrifugazione se i campioni sono opachi o contengono particolato.

5 MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Pipette per 25 µL e 100 µL.
- Cilindri per misurare diversi volumi per ricostituire o diluire i reagenti.
- Acqua pura.
- Spettrofotometro per piastre ELISA a 96 pozzetti ELISA capace di misurare a 450 nm e 405 nm.
- Agitatore per piastre ELISA, capace di fare 500 movimenti/min (non un agitatore orbitale).
- ELISA pellicola adesiva

6 PREPARAZIONE DEI REAGENTI FORNITI

Conservare il test kit ed i suoi componenti se non aperti a 2 °C - 8 °C.

A	GAD₆₅ Coated stripwells - Pozzetti ricoperti di GAD₆₅ 12 strisce staccabili di 8 pozzetti (96 totale) in un sostegno e chiusi in una busta di alluminio. Permettere di restare a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) per almeno 30 minuti prima dell'apertura. Fissare le strisce fermamente nel sostegno fornito. Dopo l'apertura rimettere le strisce non utilizzate nella busta e chiuderla con nastro adesivo. Rimettere questa busta dentro la busta di plastica ad auto-chiusura con il desiccante e conservarla a 2-8°C fino a 16 settimane.
B1-6	Calibratori 5, 18, 35, 120, 250, 2000 U/mL (unità sono NIBSC 97/550) 6 x 0.7 mL; pronto all'uso
C	Positive control [CONTOL +] - Controllo positivo (vedi l'etichetta per il campo di concentrazione) 0.7 mL pronto all'uso
D	Negative control [CONTOL -] - Controllo negativo 0.7 mL pronto all'uso
E	GAD₆₅-Biotin - GAD₆₅-Biotina 3 flaconi liofilizzati <u>Ricostituire</u> ogni flacone con 5.5 mL di tampone per la ricostituzione di GAD Biotina (F). Se più di un flacone sono usati, raccogliere i contenuti dei flaconi e mescolare gentilmente prime dell'uso. Conservare a 2-8°C fino a 3 giorni dopo la ricostituzione.
F	Reconstitution Buffer for GAD-Biotin - Tampone per la ricostituzione di GAD-Biotina 2 x 15 mL, colorato di rosso. Pronto all'uso
G	Streptavidin Peroxidase - Perossidasi di streptavidina (SA-POD) 1 x 0.7 mL concentrato <u>Diluire</u> 1 a 20 con il diluente per diluire SA-POD (H). Per esempio 0.5 mL (G) + 9.5 mL (H). Conservare a 2-8°C fino a 16 settimane dopo la diluizione.
H	Diluent - Diluente per SA-POD 15 mL pronto all'uso
I	Peroxidase Substrate (TMB) - Substrato di perossidasi (TMB) 15 mL pronto all'uso
J	Wash Solution - Soluzione di lavaggio concentrato 125 mL concentrato <u>Diluire</u> 10 X con acqua prima dell'uso Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza del kit.
K	Stop Solution - Soluzione d'arresto 12 mL pronto all'uso

7 PROCEDIMENTO D'ANALISI

Portare tutti i reagenti a temperature ambiente (20 °C - 25 °C) per almeno 30 minuti prima dell'uso. Una pipette tipo Eppendorf è consigliata per i passaggi 4,7,10 e 11.

1. Pipettare **25 µL** dei sieri dei pazienti, degli Calibratori (B1-6) e dei controlli (C e D) nei rispettivi pozzetti (in doppio è raccomandato). Usare uno pozzetto per il bianco (passo 12)
2. Coprire il sostegno e agitare bene per 1 minuto a temperature ambiente su un agitatore per piastre ELISA (500 movimenti per minuto).
3. Usare un lavatore automatico per piastre ELISA per aspirare e lavare i pozzetti tre volte con la soluzione di lavaggio diluita (J). Se non è disponibile un lavatore automatico, vuotare i pozzetti capovolgendoli bruscamente su un apposito recipiente, lavarli tre volte manualmente e finalmente asciugarli appoggiando i pozzetti invertiti su una superficie assorbente.

4. Pipettare **100 µL** di GAD Biotina ricostituita (E) in ogni pozzetto (senza bianco). Evitare che il materiale fuoriesca dai pozzetti durante l'aggiunta.
5. Coprire il telaio e incubare a temperatura ambiente per 1 ora su un agitatore per piastre ELISA (500 movimenti per min).
6. Ripetere il passaggio di lavaggio 3.
7. Pipettare **100 µL** della perossidasi di streptavidina diluita (G) in ogni pozzetto (senza bianco).
8. Coprire il telaio e incubare a temperatura ambiente per 20 minuti su un agitatore per piastre ELISA (500 movimenti per min).
9. Ripetere il passaggio di lavaggio 3. Se si lava manualmente aggiungere un ulteriore passaggio di lavaggio con acqua (per rimuovere schiume) prima di invertire ad asciugare i pozzetti.
10. Pipettare **100 µL** di TMB (I) in ogni pozzetto (incluso bianco) e incubare al buio a temperatura ambiente per 20 minuti senza agitare.
11. Pipettare **100 µL** della soluzione d'arresto (K) in ogni pozzetto (incluso bianco), coprire la piastra e agitare per ca. 5 secondi su un agitatore. Assicurarsi che il tempo d'incubazione sia lo stesso per tutti i pozzetti.
12. Determinare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm e 405 nm entro 15 minuti usando uno spettrofotometro per piastre, calibrando contro un pozzetto contenente soltanto 100 µL di TMB (I) e 100 µL della soluzione d'arresto (K).

8 ANALISI DEI RISULTATI

Una curva di calibrazione può essere costruita riportando la concentrazione del calibratore sull'asse x (scala log) e l'assorbanza dei calibratori sull'asse y (scala lineare). La concentrazione degli autoanticorpi anti-GAD nei sieri dei pazienti può essere direttamente letta dalla curva standard, [tracciata in DRG come una curva "log/lin spline" (fattore di smoothing = 0)]. Altri programmi di elaborazione dati possono essere utilizzati.

Al controllo negativo può essere assegnato un valore di 0,5 U/mL per assistere il processamento analitico dei risultati.

La maggior parte dei sieri avrà valori inferiore a 250 U/mL e il calibratore a 2000 U/mL non deve essere necessariamente incluso.

Campioni con concentrazioni alte di GAD autoanticorpi possono essere diluiti in un siero negativo a GAD Ab o nel controllo negativo del kit (D).

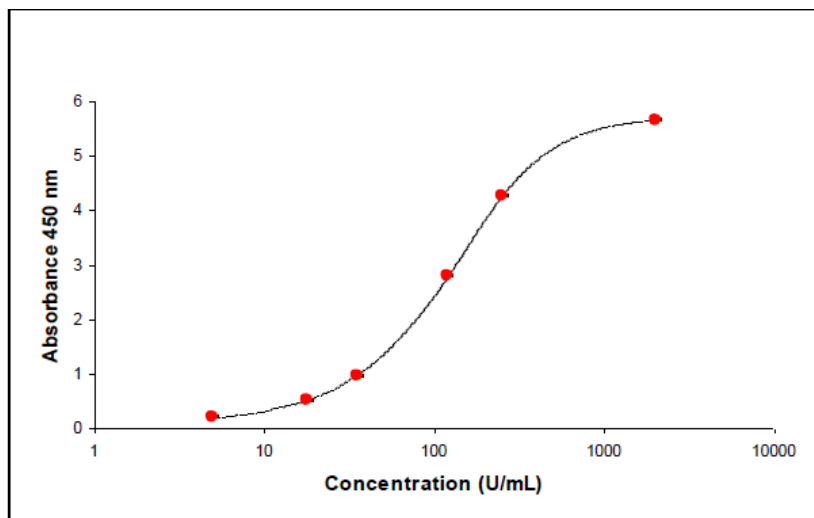
Per esempio, 20 µL del campione più 180 µL del diluente per dare una diluizione 10x. Altre diluizioni (p.es. 100x) possono essere preparati dalla diluizione 10x o in altra maniera appropriata.

Alcuni sieri non si comportano in maniera lineare quando diluiti a differenza dei calibratori del kit (standardizzati contro NIBSC 97/550).

RISULTATI TIPICI (soltanto esempi, da non usare per calcolare risultati)

Calibratori	A 450 nm	Conc. U/mL	A 405 nm	Conc. U/mL
B1	0.199	5	0.061	5
B2	0.527	18	0.164	18
B3	0.975	35	0.301	35
B4	2.794	120	0.843	120
B5	4.264	250	1.254	250
B6	5.671	2000	1.668	2000
Controllo negativo (D)	0.035	0	0.012	0
Controllo positivo (C)	1.374	49.2	0.418	49.6

Letture d'assorbanza a 405 nm possono essere convertiti a valori a 450 nm moltiplicando con un fattore appropriato (3,4 nel caso degli strumenti usati dal DRG).



9 VALORE SOGLIA DEL TEST

Valore soglia U/mL

Negativo	< 5 U/mL
Positivo	≥ 5 U/mL

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire il proprio campo di valori normali o patologici per i livelli di GAD autoanticorpi. Si raccomanda che ciascun laboratorio includa il suo proprio campo di sieri di controllo per il test.

10 VALUTAZIONE CLINICA

10.1 Specificità e sensitività clinica

Nello studio DASP 2005 il test GAD Ab ELISA raggiunse 98% (n = 100) in specificità e 92% (n = 50) in sensitività.

10.2 Limite di rilevabilità inferiore

Il controllo negativo del test è stato determinato 20 volte e il valore medio e la deviazione standard sono stati calcolati. Il limite di rilevabilità inferiore a +2 deviazioni standard era di 0,57 U/mL.

10.3 Precisione Inter Assay

Campione	U/mL (n=20)	CV (%)
A	97	5,7
B	21	5,2
C	5.7	6,4

10.4 Precisione Intra Assay

Campione	U/mL (n=25)	CV (%)
1	97	7,3
2	20	8,5
3	7.0	3,5

10.5 Accuratezza clinica

L'analisi di sieri di pazienti con malattie autoimmuni diversi da tipo 1 DM non hanno portato ad alcuna interferenza degli autoanticorpi con tiroglobulina o perossidasi tiroidale (n = 10) o recettore TSH (n = 20).

Un campione positivo per dsDNA (n = 10) e un campione positivo per il fattore reumatico (n=30) erano positivi per GAD Ab.

10.6 Interferenza

Nessuna interferenza è stata osservata se i campioni sono stati arricchiti con il seguente materiale: emoglobina fino a 5 mg/mL, bilirubina fino a 20 mg/dL o lipidi fino a 3000 mg/dL.

11 CONSIDERAZIONI DI SICUREZZA

Streptavidin Peroxidase (SA-POD)

Avvertenza: Attenzione



Indicazione di pericolo

H317: Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consiglio di prudenza

P261: Evitare di respirare la nebbia/i vapori

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.

P302 + P352: IF ON SKIN: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.

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

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

P501: Smaltire il contenuto/contenitore in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali, in conformità con le normative locali, regionali, nazionali e/o internazionali.

Peroxidase Substrate (TMB)

Avvertenza: Pericolo



Indicazione di pericolo

H360D: Può nuocere al feto.

Consiglio 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.

P308 + P313: IN CASO di esposizione o di temuta esposizione, consultare un medico.

P501: Smaltire il contenuto/contenitore in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali, in conformità con le normative locali, regionali, nazionali e/o internazionali.

Diluente per SA-POD

Indicazioni di pericolo

EUH208: Contiene 2-cloroacetamide. Può provocare una reazione allergica

- Questo test kit è inteso soltanto per l'uso in vitro da parte di personale professionale.
- Seguire attentamente le istruzioni.
- Osservare le date di scadenza sugli etichetti e la stabilità specifica per i pozzetti ricoperti, i reagenti ricostituiti e diluiti.
- Riferirsi al documento di sicurezza per informazioni sulla sicurezza più dettagliate.
- Materiale di origine umano usato per la preparazione di questo kit è stato analizzato e trovato non reattivo per HIV1 e 2 e anticorpi HCV e HbsAg. Ciononostante esso dovrebbe essere trattato come potenzialmente infettivo. Lavare le mani dopo contaminazione e prima di uscire dal laboratorio.
- Sterilizzare ogni rifiuto potenzialmente infetto, incluso i campioni del test, prima di scaricarli.
- Materiale di origine animale usato per la preparazione di questo test sono stati ottenuti da animali certificati sani, ma dovrebbe essere trattato come potenzialmente infettivo. Alcuni componenti contengono piccole quantità di azide di sodio come conservante.
- Evitare l'ingestione, inalazione, iniezione o il contatto con la pelle, gli occhi e i vestiti di tutti i componenti del kit.
- Evitare la formazione di azidi di metalli pesanti del sistema di scarica sciacquando i componenti del kit con grandi quantità d'acqua.

12 SCHEMA DEL SAGGIO

Portare tutti i reagenti e campioni a temperature ambiente (20 °C – 25 °C) prima dell'uso.	
Pipettare:	25 µL Calibratori (B1-6), Controlli (C e D) e sieri dei pazienti (senza bianco)
Incubare:	1 ora a temperature ambiente su un agitatore ELISA a 500 movimenti/min
Aspirare/Decantare:	piastra ELISA (A)
Lavare:	Piastra ELISA (A) tre volte e asciugare su materiale assorbente ¹
Pipettare:	100 µL GAD ₆₅ Biotina (E) (ricostituita) in ogni pozzetto (senza bianco)
Incubare:	1 ora a temperature ambiente su un agitatore ELISA a 500 movimenti/min
Aspirare/Decantare:	piastra ELISA (A)
Lavare:	Piastra ELISA (A) tre volte e asciugare su materiale assorbente ¹
Pipettare:	100 µL SA-POD (G) (diluito 1:20) in ogni pozzetto (senza bianco)
Incubare:	20 min a temperature ambiente su un agitatore ELISA a 500 movimenti/min
Aspirare/Decantare:	piastra ELISA (A)
Lavare:	Piastra ELISA (A) tre volte, lavare 1 volta con acqua e asciugare su materiale assorbente ¹
Pipettare:	100 µL TMB (I) in ogni pozzetto (incluso bianco)
Incubare:	20 minutes a temperature ambiente al buio (senza agitare)
Pipettare:	100 µL soluzione d'arresto (K) in ogni pozzetto e agitare per 5 secondi (incluso bianco)
Determinare l'assorbanza a 450 nm e 405 nm entro 15 minuti.	
¹ Non è necessario asciugare la piastra dopo il lavaggio quando un lavatore automatico viene adoperato. Il passaggio di lavaggio con acqua può essere ommesso con un lavatore automatico.	

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation	Consultar as instruções de uso
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Catalogue number *	Katalognummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Número de catálogo
	Batch code *	Chargen-bezeichnung *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código do lote
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> determinações
	Temperature limit *	Temperaturgrenzwerte *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Temperature de conservation	Limites de temperatura
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Prazo de validade
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante
	Distributor *	Vertriebspartner *	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuidor
	Date of manufacture *	Herstellungsdatum *	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production	Data de fabricação
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques	Riscos biológicos
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention	Cuidado
	Unique device Identifier *	eindeutige Produktidentifizierung *	Identificativo unico del dispositivo*	Identificación exclusiva del dispositivo *	Identifiant de dispositif unique*	Identificador único do dispositivo *
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches	
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité	Volume / Quantidade