

Isletest™ - GAD

REF

7009

Test ELISA cualitativo para la detección de autoanticuerpos en la circulación contra los antígenos GAD

febrero 2018



I. USO PREVISTO

Isletest - GAD es un test ELISA cualitativo *in vitro* para la detección de autoanticuerpos en la circulación para el antígeno descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en personas con alto riesgo prediabético así como en pacientes con diabetes mellitus insulino dependiente (DMID).

II. ANTECEDENTES

La diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), tipo 1, está causada por la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas (1, 2). Esta patogénesis autoinmune selectiva provoca la completa eliminación de la secreción de insulina. La evidencia inmunológica se demostró por la presencia de autoanticuerpos específicos contra las células del islote en el suero sanguíneo de los pacientes de DMID (3). Se han identificado al menos tres autoanticuerpos contra los componentes antigénicos de las células del islote en los pacientes de diabetes tipo 1. Estos autoanticuerpos se dirigen específicamente a los componentes antigénicos de las células del islote (4), a la descarboxilasa del ácido glutámico (5) y a la insulina (6).

La descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) es la enzima biosintética para el ácido gama amino butírico neurotransmisor inhibidor GABA (7). Un solo gen produce dos clases de GAD, 65 Kda y 67 Kda, ambas muy homogéneas (8-10). La GAD 65-Kda y la GAD 67-Kda se identifican en células del cerebro y del islote y se expresan de manera diferente en el páncreas humano, en el de la rata y en el del ratón (11,12).

Como la diabetes es una enfermedad autoinmune crónica que conlleva la destrucción de las células beta, la predicción exacta del inicio de la enfermedad en la etapa preclínica (asintomática) ayudaría a intervenir en la destrucción de las células del islote y a proteger la mayor masa posible de células beta. La predicción en poblaciones de alto riesgo, para los tres autoanticuerpos (ICA, IAA y GAD), ayudará a prevenir o a ralentizar el inicio de la enfermedad. Una población de alto riesgo (asintomática), que dé positivo en dos o más autoanticuerpos, es vulnerable a desarrollar la DMID, normalmente en los 5-7 años siguientes (13,14).

III. PRINCIPIO DEL TEST

Se inmoviliza un antígeno GAD purificado en micropocillos. Se permite que los anticuerpos IgG específicos del GAD presentes en la muestra del suero sanguíneo del paciente reaccionen con el antígeno. Las proteínas excedentes/sueltas del suero se eliminan de los micropocillos. Se añade un anticuerpo de cabra enzimático (fosfatasa alcalina), específico para las IgG humanas, al complejo GAD-anticuerpos. Tras lavar el conjugado enzimático excedente que no reacciona de los micropocillos, se añade un sustrato (PNPP) y el color obtenido se mide espectrofotométricamente. La intensidad del color obtenido proporciona directamente la concentración de autoanticuerpos GAD en la muestra del suero de prueba. Los controles de GAD positivos y negativos sirven como control de calidad interno para garantizar la validez de los resultados.

IV. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Material de riesgo biológico potencial

La matriz de los calibradores y los controles es el suero humano. Se ha comprobado con reactivos autorizados por la FDA que el suero humano utilizado no es reactivo a HbsAg, anti-VIH 1/2 ni anti-HCV. Dado que no hay ninguna otra prueba que pueda ofrecer una garantía completa de la ausencia de los virus VIH, de hepatitis B u otros agentes infecciosos, estos reactivos deben considerarse potencialmente infecciosos.

2. Azida sódica

Algunos reactivos contienen azida sódica como conservante. La azida sódica puede reaccionar con el plomo, el cobre o el bronce y formar azidas metálicas explosivas. Al desechar estos materiales, enjuague siempre con abundante agua para evitar la acumulación de azidas.

3. Solución de parada

La solución de parada se compone de 1N de NaOH. Se trata de una base concentrada que debe manejarse con precaución. Puede provocar quemaduras, por lo que debe ponerse guantes. Es necesario llevar gafas y ropa protectora adecuada. Evite la inhalación. Diluya con agua cualquier derrame antes de utilizar toallas de papel para absorberlo.

4. Solución de sustrato

Solución de sustrato consiste de para-Nitrofenilfosfato (PNPP), un sustrato cromógeno non-proteicos usado en esta prueba de ELISA. En ocasiones, el sustrato puede mostrar un color amarillento. Este color no interferirá con los resultados de la prueba.

Precauciones

1. No congele los reactivos del test, guarde siempre todos los componentes a 2 - 8°C.
2. Los controles positivos y negativos deben realizarse cada vez que se realice el test.
3. Use sólo suero claro como muestra para el test. La muestra del test no debe presentar turbiedad, hemólisis o contaminación microbiana.
4. Todas las muestras se analizarán en duplicado.
5. No mezcle reactivos de lotes diferentes.
6. No emplee reactivos caducados.
7. No permita que los reactivos queden a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo.
8. No exponga la solución de sustrato a la luz.
9. Es necesaria una cuidadosa técnica de pipeta para conseguir unos resultados reproducibles y exactos.

V. REACTIVOS Y MATERIALES

Materiales suministrados:

1. **PLA GAD** = Tiras de micropocillo con GAD (con soporte)..... 12 tiras
2. **CONJ ENZ 6X** = Conjugado enzimático GAD (conc.) 2 x 1,0 ml
3. **DIL SPE 5X** = Diluyente de muestra de Isletest (concentrado).... 1 x 25,0 ml
4. **CONJ ENZ DIL** = Diluyente de conjugado Isletest 1 x 10,0 ml
5. **CAL GAD 1-3** = GAD – Calibradores (1,2,3) (suero humano)..... 1 x 1,5 ml
6. **CTRL – GAD** = Control negativo - GAD (suero humano) 1 x 1,5 ml
7. **CTRL + GAD** = Control positivo - GAD (suero humano)..... 1 x 1,5 ml
8. **SUBS PNPP** = Solución de sustrato Isletest (PNPP) 1 x 15,0 ml
9. **BUF WASH 25X** = Tampón de lavado Isletest (concentrado).... 1 x 20,0 ml
10. **SOLN STP** = Solución de parada Isletest (1N NaOH) 1 x 6,0 ml

VI. MATERIALES ADICIONALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Toallitas de papel absorbente para secar las tiras tras el lavado y láminas de cierre/tapas de plástico para cubrir las tiras durante las incubaciones.
3. Tubos de cristal de tamaño adecuado para la dilución del suero.
4. Micropipetas con puntas desechables para dosificar 10 µl, 50 µl y 100 µl.
5. Una lavadora de placa microtiter o una botella vertedora para el lavado.
6. Pipetas de 5 ml para la dosificación del diluyente de conjugado.
7. Un cilindro graduado de 500 ml.
8. Un lector de placas microtiter con 405 nm de capacidad de absorbencia.
9. Cinta de etiqueta plástica, para encintar los pocillos sin usar antes del ensayo.

VII. RECOPIACIÓN DE MUESTRAS

Extraiga 5-10 ml de sangre por venipunción y viértalos en un tubo (parte superior roja). Se pueden usar separadores de suero. Separe el suero por centrifugación. Las muestras de suero se pueden guardar a 2 - 8°C. La hemólisis excesiva y la presencia de grandes coágulos o crecimiento microbiano en la muestra del test puede repercutir en el rendimiento del test. Congele la muestra de suero a -20°C si no se puede analizar en un plazo de 24 horas.

VIII. PREPARACIÓN REACTIVA Y ALMACENAMIENTO

1. Reconstitución del conjugado enzimático GAD:

Se transfieren con exactitud 5 ml de diluyente de conjugado en una botella con 1 ml del conjugado enzimático (concentrado). Se cierra la botella y se mezcla mediante inversiones. Guarde el conjugado diluido a 2 - 8°C cuando no se use. Se registra la fecha de reconstitución en la etiqueta. El reactivo diluido caduca a los 30 días tras la reconstitución. Cada botella contiene suficiente conjugado para 6 tiras. Se debe reconstituir según sea necesario.

2. Tampón del diluyente de la muestra de Isletest:

Si precipitado está presente en el diluyente de muestra debido al almacenamiento en baja temperatura como 2-8°C, disolver colocando el frasco en un baño de agua de 37°C durante 30 minutos. Vierta todo el contenido (25 ml) en 100 ml de agua destilada/desionizada en un contenedor adecuado. Mezcle a fondo, etiquete el contenedor como Diluyente de muestra de Isletest y guárdelo a 2 - 8°C. El reactivo diluido es estable hasta la caducidad que se muestra en el vial. Nota que el precipitado en el

concentrado produce ningún efecto en el rendimiento de la prueba y no estará presente en la 1X diluyente de muestra.

3. Solución de lavado Isletest:

Si el concentrado de amortiguador de lavado contiene cristales debido al almacenamiento a una temperatura menor, como podría ser 2-8°C, disuélvalo colocando el vial en el baño María a 37°C o en una incubadora durante 30 minutos. Vierta todo el contenido en 480 ml de agua destilada/desionizada en un contenedor de 500 ml. Mezcle a fondo, etiquete el contenedor como Lavado Isletest y guárdelo a 2 - 8°C. El reactivo diluido es estable hasta la caducidad que se muestra en el vial.

4. Preparación de la muestra de suero:

Con una pipeta, vierta exactamente 10 µl (0,010 ml) de muestra de suero en 1,0 ml del diluyente de muestra de trabajo en un tubo de cristal ya etiquetado. Mezcle a fondo.

IX. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El kit del test contiene 12 tiras de micropocillo recubiertas con antígeno GAD purificado. El número de tiras de micropocillo que se use en cada ensayo depende del número de muestras de suero que se van a examinar. Si se usan 12 tiras de micropocillo, se pueden hacer pruebas en duplicado en sueros de 42 pacientes con este kit.

NOTA IMPORTANTE: Guarde todos los reactivos, incluidas las muestras de suero, a temperatura ambiente (25°C) antes de empezar el ensayo. Las temperaturas de incubación que varíen en más de ± 1°C pueden afectar definitivamente a los resultados.

1. Reúna el número de tiras necesarias para una prueba en el soporte proporcionado. La tira de micropocillo debe asegurarse firmemente en su lugar o podría caerse y romperse.
2. Familiarícese con el sistema de indexación de pocillos, p. ej., número de pocillo A1, B1, C1, D1, etc. y etiquete las tiras con un rotulador.
3. Disponga los calibradores de 100 µl (0,1 ml), los controles positivos y negativos, y las muestras de suero diluido en los micropocillos adecuados. Los pocillos A1 y B1 se reservan en blanco y no contienen muestras.
4. Proteja la placa con una cubierta de película o plástico (para prevenir su contaminación) e incube la placa durante 1 hora a temperatura ambiente (25°C ± 1°C).
5. Tras 1 hora de incubación, vuelque el contenido en los micropocillos y seque la placa mediante toques suaves con una toallita de papel unas cuantas veces. Si se utiliza una lavadora de placas automática, lave cada pocillo 3 veces con 300 µl (0,3 ml) de la solución tampón de lavado. Si se utiliza una botella vertedora, llene los pocillos con el tampón de lavado con cuidado y después vierta el tampón de los micropocillos. Evite que se formen burbujas de aire en el pocillo durante el lavado. Repita el procedimiento de lavado dos veces más (es decir, en total 3 veces). Seque la placa con una toallita de papel unas cuantas veces al final de cada lavado.
6. Añada 100 µl (0,1 ml) de reactivo de conjugado enzimático reconstituido (véase n.º 1; Sección VIII, Preparación del reactivo) en todos los micropocillos, excepto en los pocillos A1 y B1.
7. Proteja la placa con una cubierta de película o plástico e incúbela en **la oscuridad** a temperatura ambiente (25°C ± 1°C) durante una hora.
8. Al final de la incubación, lave los micropocillos tres veces como se ha descrito más arriba (véase el paso n.º 5).

9. Añada 0,1 ml (100 µl) de solución de sustrato a todos los micropocillos, incluidos los pocillos A1 y B1. Asegúrese de verter el reactivo de sustrato a un ritmo rápido y fijo sin interrupciones. En ocasiones, el sustrato puede mostrar un color amarillento. Este color no interferirá con los resultados de la prueba.
10. Cubra la placa y déjela a oscuras durante 30 minutos a temperatura ambiente ($25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$).
11. Al final de los 30 minutos tras la adición del sustrato, añada 50 µl (0,05 ml) de la solución de parada en cada pocillo a un ritmo rápido y fijo sin interrupciones.
12. Disponga en blanco el lector de placas y lea la absorbencia de la placa a 405 nm. Los pocillos A1 o B1 se pueden usar para poner en blanco el lector de placas. No contienen muestras, ni conjugado, sólo reactivo de sustrato y solución de parada.
13. Calcule los datos según lo indicado en la Sección X.

X. CÁLCULO DE DATOS

Para realizar los cálculos manualmente, dibuje una curva dosis-respuesta (DRC) en papel milimetrado para gráficos, trazando cada valor del calibrador (como se indica en la etiqueta del vial del calibrador) sobre el eje X y su correspondiente valor de absorbencia en el eje Y. Trace una línea que represente la línea recta que mejor encaje entre los tres puntos. Determine el valor de GAD en el suero de cada paciente mediante su valor de absorbencia y extrapolando a partir de la DRC en el eje X.

Para realizar los cálculos automáticamente, la absorbencia de la muestra de suero de cada paciente debe convertirse a valores de GAD mediante el programa informático de regresión lineal que mejor se ajuste. Los valores de GAD indicados en cada etiqueta de los calibradores deben introducirse como estándares. Los valores se expresan como Unidades/ml de Biomerica.

El valor de GAD de cada muestra se interpreta de la siguiente manera:

Valor de GAD (U/mL)	Resultado
<1,00	Negativo
>1,05	Positivo
1,00-1,05	Indeterminado (entre los límites)

Un resultado positivo (>1,05) indica la presencia de autoanticuerpos GAD en la muestra de suero del paciente. Un resultado negativo (<1,00) indica la ausencia de autoanticuerpos GAD o una presencia inferior al límite de resolución del test. Si se obtiene un valor indeterminado (entre los límites) (1,00-1,05), debe repetirse el test de la muestra. Si al repetir el test obtiene un valor negativo, debe considerar la muestra negativa. Si al repetir el test obtiene un resultado positivo, debe considerar la muestra de suero positiva. Si se obtiene un valor dentro de los límites tras repetir el test, debe tomar otra muestra más tarde para hacer las pruebas según las instrucciones del médico.

ISLETTEST™-DATOS DE MUESTRA GAD

Sección A: Valores de calibrador y Resultados de control

Controles	Media de DO	Valor de GAD	Resultado
Calibrador n°1	0,346	0,613	
Calibrador n°2	0,634	1,124	
Calibrador n°3	1,687	2,991	
Control negativo	0,188	0,32	-
Control positivo	1,24	2,2	+

NOTA: No utilice estos datos para valores experimentales reales. Esto sólo es un ejemplo.

Valor de GAD: Negativo	< 1,00 U/ml
Positivo	> 1,050 U/ml
Indeterminado	1,00-1,050 U/ml (entre los límites)

Las unidades son unidades de Biomerica

Sección B: Resultados de la muestra del paciente

Muestra	Media de DO	Valor de GAD	Resultado
1	0,375	0,664	-
2	0,273	0,484	-
3	0,662	1,173	+

XI. CONTROL DE CALIDAD

Los controles negativos y positivos deben realizarse junto con muestras desconocidas cada vez para que los resultados sean válidos. El control negativo debe mostrar un valor < 1,0 Unidades/ml y el control positivo un valor > 1,0 Unidades/ml.

XII. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Reactividad cruzada

No se observaron interferencias significativas de ANA, ADN y los factores reumatoideos. Las muestras de suero con autoanticuerpos anti-Tg y anti-TPO mostraron poca o ninguna reactividad cruzada.

Precisión

La fiabilidad del test ELISA Isletest-GAD de Biomerica se evaluó mediante el examen de su reproducibilidad con muestras clínicas confirmadas para autoanticuerpos GAD.

Intraensayo (en la realización):

Muestra	N	Valor medio de GAD	S.D.	% C.V.
1	20	0,560	0,038	5,4
2	20	1,771	0,035	4,8

Intraensayo (entre realizaciones):

Muestra	N	Valor medio de GAD	S.D.	% C.V.
1	10	0,424	0,074	4,6
2	10	1,542	0,040	4,5

Especificidad y Sensibilidad

Se testaron un total de 99 muestras de suero de paciente confirmado para autoanticuerpos GAD. De estas muestras, 39 se confirmaron negativas y las restantes 60 muestras se confirmaron positivas. Los resultados del test ELISA Isletest-GAD de las muestras se presentan en la tabla siguiente:

N.º total de Muestras testadas	Total Negativo ¹	Total Positivo ²	Falsa Positivo ³	Falsa Negativo ⁴
99	34	51	5	9

- (1) Negativo tanto en el test ELISA Isletest-GAD como en el test de referencia
 - (2) Positivo tanto en el test ELISA Isletest-GAD como en el test de referencia
 - (3) Positivo en el test ELISA Isletest-GAD y negativo en el test de referencia
 - (4) Negativo en el test ELISA Isletest-GAD y positivo en el test de referencia
- Exactitud en porcentaje: 85,8%
Especificidad en porcentaje: 87.1%
Sensibilidad en porcentaje: 85.0%

Recuperación

Los estudios de recuperación se realizaron con el test ELISA Isletest-GAD mediante muestras de suero previamente confirmadas con valores conocidos de autoanticuerpos GAD.

Autoanticuerpo añadido (Valor de GAD)	Autoanticuerpo recuperado (Valor de GAD)	% de recuperación
3,620	3,432	94,5%
1,491	1,594	106,9%
0,915	0,825	90,2%
1,180	1,080	91,5%

XIII. LIMITACIONES Y FUENTES DE ERROR









- Aunque una disolución más alta de GAD produciría una lectura de los datos de DO obtenidos superior, el test se ha diseñado para la determinación semicuantitativa de los autoanticuerpos GAD en muestras de suero de test.
- Una reproducibilidad insuficiente del test puede deberse a:
 - Una dosificación incorrecta de los reactivos
 - Un almacenamiento incorrecto de los reactivos
 - Una reconstitución incorrecta de los reactivos
 - Un lavado incompleto de los micropocillos
 - Un reactivo de sustrato viejo o expuesto a la luz
 - Un espectrofotómetro inestable o defectuoso
 - Un error en la realización del procedimiento de ensayo

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Cooke, A. (1990). An overview on the possible mechanism of destruction of the insulin-producing beta cell. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **164**:125-142.
- Harrison, L.C., I.L. Campbell, P.G. Colman, et al (1990). Type 1 diabetes: Immunology and Immunotherapy. *Adv. Endocrinol. Metab.* **1**:35-94.
- Bottazzo, G.F., A. Florin-Christensen, and D. Doniach (1974). Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, **ii**:1279-1283.
- Colman, P.G., R.C. Nayak, I.L. Campbell, and g.s. Eisenbarth (1988). Binding of cytoplasmic islet cell antibodies is blocked by human pancreatic glycolipin extract. *Diabetes*, **37**:645-652.
- Baekkeskou, S., J.H. Nielson, and B. Marnier, et al. (1982). Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature*, **298**:167-169.
- Palmer, J.P., C.M. Aspilin, P. Clemons, et al. (1983). Insulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment. *Science*, **222**:1337—1339.
- Erlander, M.G. and A. J. Tobin (1991). The structure and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem. Res.*, **16**:215-226.
- Bu, D.F., M.G. Erlander, B.C. Hitz, N.J. Tillakaratne, et al. (1992). Two human glutamic decarboxylases, 65-kda GAD and 67-kda GAD, are encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:2115-2119.
- Christgau, S., H. Schierbeck, H.J. Aunstoet, L. Aaggard, et al. (1991). Pancreatic B-Cells express two autoantigenic forms of glutamic acid decarboxylase, a 65-kda hydrophilic form and a 64-kda amphiphilic form which can be both membrane-bound and soluble. *J. Biol. Chem.*, **266**:21257-21269.
- Clare-Salzler, M.J., A.J. Tobin, and D.L.O. Kaufman (1992). Glutamate decarboxylase: an autoantigen in IDDM. *Diabetes Care*, **15**:132-135.


- Giorda, R., M. Peakman, K.C. Tan, D. Vergani, and M. Trucco (1991). Glutamic acid decarboxylase expression in islets and brain. *Lancet*, **338**:1469-1470.
- Kim, J., W. Richter, H.J. Aunstoet, Y. Shi, Q. Fu, et al. (1993). Differential expression of GAD 65 and GAD 67 in humans, rat and mouse pancreatic islets. *Diabetes*, **42**:1799-1808.
- Dean, B.M., F. Becker, J.M. McNally, A.C. Tarn, et al. (1986). Insulin autoantibodies in the pre-diabetic period: correlation with islet cell antibodies and development of diabetes. *Diabetologia*, **29**:339-342.
- Komalesh, M., A. Karasik, and S. Srikanta (1986). Islet cell antibodies as predictors of insulin-dependent diabetes mellitus. *Pract. Cardiol.*, **12**:79-91.

XV. SÍMBOLOS

	Temperatura del almacenamiento
	Código de la serie
	Vencimiento
	Fabricante
	Representante autorizado
	Cuidado, vea las instrucciones
	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	N. catalogo

XVI. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

PEDIDOS: Envíe su pedido de compra a:

 BIOMERICA, INC.
17571 Von Karman Avenue
Irvine, California 92614
U.S.A.

2°C / 8°C





Teléfono: (949) 645-2111
FAX: (949) 553-1231
Sitio web: www.biomerica.com
Correo electrónico: bmra@biomerica.com

67009-05_spa.doc

febrero 2018



de acuerdo con IVDD 98/79/ EC
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover
Alemania