

VERSION INTERNATIONALE

Isletest™ - GAD

REF 7009

Test ELISA qualitatif pour la détection d'auto-anticorps circulants contre les antigènes GAD

février 2018



I. APPLICATION

Isletest - GAD est un test ELISA qualitatif *in vitro* pour la détection des auto-anticorps circulants qui visent l'antigène d'acide glutamique-décarboxylase (GAD) chez les individus prédiabétiques à risque élevé ainsi que chez les patients atteints du diabète DID (diabète insulino-dépendant).

II. CONTEXTE

Le diabète de type 1, ou DID (diabète insulino-dépendant), est provoqué par la destruction auto-immune des cellules β du pancréas (1,2). Cette pathogenèse auto-immune sélective aboutit à l'élimination complète de la sécrétion d'insuline. La présence d'auto-anticorps d'îlots pancréatiques spécifiques dans les sérums de patients atteints du diabète DID (3) en a apporté la preuve immunologique. Au moins trois auto-anticorps contre les composants antigéniques des cellules d'îlots chez des patients atteints du diabète de type 1 ont été identifiés. Ces auto-anticorps sont spécifiquement dirigés contre un composant ou des composants antigénique(s) des cellules d'îlots pancréatiques (4), l'enzyme acide glutamique-décarboxylase (5) et l'insuline (6).

L'acide glutamique-décarboxylase (GAD) est l'enzyme biosynthétique qui constitue l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) agissant comme un neuromédiateur inhibiteur(7). Deux formes de GAD, de 65 Kda et 67 Kda, sont produites par un gène unique et sont très homogènes (8-10). On trouve des GAD 65 Kda et des GAD 67 Kda dans le cerveau et les cellules des îlots et elles sont exprimées de façon différente dans les pancréas de l'être humain, du rat et de la souris (11,12).

Le diabète étant une maladie auto-immune chronique qui détruit les cellules β , il est important d'établir un pronostic précoce et précis de l'apparition de la maladie à la phase préclinique (asymptomatique) pour pouvoir intervenir contre la destruction des îlots et pour préserver le maximum possible de masse des cellules β . Le dépistage des trois auto-anticorps (ICA, IAA et GAD) chez les populations à haut risque permettra de prévenir ou de ralentir la manifestation de la maladie. Une population à haut risque (asymptomatique), réagissant positivement à deux auto-anticorps ou davantage, est susceptible de développer un diabète DID, généralement dans les 5 à 7 années suivantes (13,14).

III. PRINCIPE DU TEST

Un antigène GAD purifié est fixé sur des micropuits. On laisse réagir les anticorps IgG spécifiques du GAD présents dans l'échantillon de sérum du patient avec l'antigène. Les protéines de sérum excédentaires ou libres sont éliminées, par lavage, des micropuits. Une enzyme (phosphatase alcaline) désignée comme un anticorps de chèvre, spécifique à l'IgG humaine est ajoutée au complexe anticorps-GAD. Après avoir retiré des micropuits, par lavage, l'excès du conjugué enzymatique non fixé, on ajoute un substrat (PNPP) et on mesure à l'aide d'un spectrophotomètre la couleur ainsi produite. L'intensité de la couleur développée indique directement la concentration en auto-anticorps anti-GAD dans l'échantillon de sérum du test. Les contrôles positif et négatif aux GAD servent de mesure de qualité interne pour garantir la validité des résultats.

IV. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Risque biologique

Les étalons et contrôles sont constitués de sérum humain. Le sérum humain utilisé a été testé quant à l'absence d'anticorps HbsAg, anti-VIH 1/2 et anti-hépatite C avec des réactifs agréés par la FDA. Néanmoins, comme il n'existe aucune méthode d'analyse qui puisse totalement garantir l'absence de virus VIH, de l'hépatite B ou de tout autre agent infectieux, ces réactifs doivent être manipulés avec les précautions habituellement observées avec des échantillons présentant un risque biologique.

2. Azide de sodium

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. L'azide de sodium peut réagir avec le plomb, le cuivre ou le laiton pour former des azides métalliques explosifs. Après évacuation de ces produits dans les canalisations, faire couler l'eau abondamment afin d'éviter toute accumulation d'azide.

3. Solution blocante

La solution blocante est constituée de 1N NaOH. Il s'agit d'une base puissante qui doit être manipulée avec précaution. Il peut causer des brûlures et doit être manipulé avec des gants. Porter une protection oculaire et des vêtements de protection appropriés. Éviter toute inhalation. Diluer tout acide déversé avec de l'eau avant de l'éponger au moyen de papier absorbant.

4. Solution de substrat

Solution de substrat se compose de para-Nitrophénylphosphate (PNPP), un substrat chromogène non protéique utilisé dans ce test ELISA. À l'occasion, le substrat peut parfois présenter une couleur jaunâtre. Cette couleur n'interférera pas avec les résultats du test.

Précautions

1. Ne pas congeler les réactifs du test, conserver toujours tous les éléments de la trousse à 2-8°C.
2. Les contrôles positif et négatif doivent être utilisés chaque fois qu'un test est effectué.
3. N'utiliser que du sérum clair pour les spécimens de test. L'échantillon de test ne doit présenter aucune turbidité, hémolyse ni contamination microbienne.
4. Analyser tous les échantillons deux fois.
5. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots.
6. Ne pas utiliser de réactifs périmés.

7. Ne pas laisser des réactifs à la température ambiante pendant une longue période.
8. Ne pas exposer la solution de substrat à la lumière.
9. Une technique de pipetage minutieuse est essentielle pour obtenir des résultats reproductibles et précis.

V. RÉACTIFS ET MATÉRIEL

Matériel fourni :

1. **PLA GAD** = Bandelettes de micropuits GAD (avec le support)..... 12 bandelettes
2. **CONJ ENZ 6X** = Conjugué enzymatique GAD (concentré)..... 2 x 1,0 ml
3. **DIL SPE 5X** = Diluant pour l'échantillon Isletest (concentré)..... 1 x 25,0 ml
4. **CONJ ENZ DIL** = Diluant pour le conjugué Isletest..... 1 x 10,0 ml
5. **CAL GAD 1-3** = GAD - Étalons (1,2,3) (sérum humain) 1 x 1,5 ml
6. **CTRL + GAD** = GAD - Contrôle négatif (sérum humain)..... 1 x 1,5 ml
7. **CTRL - GAD** = GAD - Contrôle positif (sérum humain)..... 1 x 1,5 ml
8. **SUBS PNPP** = Solution de substrat Isletest (PNPP)..... 1 x 15,0 ml
9. **BUF WASH 25X** = Tampon de lavage Isletest (concentré) 1 x 20,0 ml
10. **SOLN STP** = Solution blocante Isletest (1N NaOH)..... 1 x 6,0 ml

VI. AUTRE MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

1. Eau distillée ou déminéralisée.
2. Papier absorbant pour égoutter les bandelettes après le lavage et emballages ou films plastiques pour les recouvrir pendant l'incubation.
3. Tubes en verre de dimension appropriée pour diluer le sérum.
4. Micropipette à extrémités jetables pour administrer 10 µl, 50 µl et 100 µl.
5. Laveur de microplaques ou flacon souple pour le lavage.
6. Pipettes de 5 ml pour administrer le diluant de conjugué.
7. Éprouvette cylindrique graduée de 500 ml.
8. Lecteur de microplaque ayant une capacité d'absorbance de 405 nm.
9. Étiquettes adhésives en plastique à apposer sur les puits non utilisés avant le dosage.

VII. COLLECTE DE SPÉCIMENS

Prélever 5-10 ml de sang par ponction veineuse dans un tube sec (bouchon rouge). Il est possible d'utiliser des séparateurs de sérum. Séparer le sérum par centrifugation. On peut conserver des échantillons de sérum à 2-8°C. Une hémolyse excessive et la présence de larges caillots ou de croissance microbienne dans le spécimen de test peuvent interférer avec son déroulement. Congeler l'échantillon de sérum à -20°C s'il ne peut être analysé en moins de 24h.

VIII. PRÉPARATION ET CONSERVATION DES RÉACTIFS

1. **Reconstitution du conjugué GAD-enzyme :**
Transférer avec précaution 5 ml de diluant de conjugué dans le flacon contenant 1,0 ml de conjugué enzymatique (concentré). Boucher le flacon et bien mélanger par retournements. Conserver le conjugué dilué à 2-8°C, en période de non utilisation. Inscrivez la date de la reconstitution sur l'étiquette. **Ce réactif dilué expire 30 jours après la reconstitution.** Chaque flacon contient une quantité de conjugué suffisante pour 6 bandelettes. Reconstituer selon les besoins.
2. **Tampon de diluant pour l'échantillon Isletest :**

Si précipité est présent dans diluant pour l'échantillon concentré en raison de conserver à basse température, comme les 2-8°C, dissoudre en plaçant le tube dans un bain d'eau à 37°C pendant 30 minutes. Transférer tout le contenu (25 ml) dans un récipient approprié contenant 100 ml d'eau distillée ou déminéralisée. Mélanger soigneusement ; inscrire sur l'étiquette du récipient, Diluant échantillon-Isletest et conserver à 2-8°C. Le réactif dilué est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le tube. Notez que le précipité vu dans le concentré n'a aucun effet sur la performance du test et ne sera pas présent dans le 1X diluant de l'échantillon actif.

3. Solution de lavage Isletest :

Si des cristaux apparaissent dans cette solution après conservation à basse température, par exemple 2-8°C, les dissoudre en plaçant la fiole dans un bain-marie ou un incubateur à 37 °C pendant 30 minutes. Transférer tout le contenu dans un récipient approprié de 500ml rempli à 480 ml d'eau distillée ou déminéralisée. Mélanger soigneusement ; inscrire sur l'étiquette du récipient, Lavage Isletest et conserver à 2-8°C. Le réactif dilué est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le tube.

4. Préparation de l'échantillon de sérum :

Pipeter avec soin 10 µl (0,010 ml) de l'échantillon de sérum dans 1,0 ml de diluant de l'échantillon actif contenu dans un tube en verre préalablement étiqueté. Mélanger soigneusement.

IX. PROCÉDURE DE DOSAGE

La trousse du test contient 12 bandelettes de micropuits recouvertes d'antigène GAD purifié. Le nombre de bandelettes de micropuits utilisé dans chaque dosage dépend du nombre d'échantillons de sérum à tester. Avec les 12 bandelettes de micropuits de cette trousse, il est possible de tester 42 sérums de patients, deux fois.

REMARQUE IMPORTANTE : Porter tous les réactifs, y compris les échantillons de sérum, à la température ambiante (25°C) avant de commencer le dosage. Des différences de température d'incubation supérieures à ± 1°C peuvent altérer les résultats de manière significative.

1. Regrouper le nombre de bandelettes nécessaire pour effectuer un test dans le récipient fourni. Faire bien adhérer la bandelette au micropuits pour éviter qu'elle ne tombe et se brise.
2. Apprendre le système de désignation des puits, par exemple, puits numéro A1, B1, C1, D1, etc. et étiqueter les bandelettes avec un stylo-feutre.
3. Verser 100 µl (0,1 ml) d'étalons, de contrôles positif et négatif et d'échantillons de sérum dilué dans les micropuits appropriés. Les puits A1 et B1 sont laissés vides et ne contiennent aucun échantillon.
4. Recouvrir la plaque d'un film ou emballage plastique (pour éviter la contamination) et l'incuber à température ambiante (25°C ± 1°C) pendant une heure.
5. Jeter ensuite le contenu des micropuits et égoutter la plaque en la secouant délicatement sur du papier absorbant. En cas d'utilisation d'un laveur de plaques automatique, laver chaque puits 3 fois avec 300 µl (0,3 ml) du tampon de lavage dilué. En cas d'utilisation d'un flacon souple, remplir soigneusement les puits avec le tampon de lavage puis les vider. Éviter la

formation de bulles d'air pendant le lavage. Répéter la procédure de lavage deux fois de plus (soit 3 fois en tout). Égoutter la plaque sur du papier absorbant à la fin de chaque lavage.

6. Ajouter 100 µl (0,1 ml) de réactif de conjugué enzymatique reconstitué (voir n° 1; Section VIII, Préparation du réactif) dans tous les micropuits sauf A1 et B1.
7. Recouvrir la plaque d'un film ou emballage plastique et l'incuber dans l'obscurité et à température ambiante (25°C ± 1°C) pendant une heure.
8. A la fin de l'incubation, laver les micropuits trois fois comme indiqué précédemment (voir étape n° 5).
9. Ajouter 0,1 ml (100 µl) de solution de substrat dans tous les micropuits, y compris les puits A1 et B1. Veiller à administrer le réactif de substrat à un rythme régulier et rapide sans interruption. À l'occasion, le substrat peut parfois présenter une couleur jaunâtre. Cette couleur n'interférera pas avec les résultats du test.
10. Recouvrir la plaque et la laisser dans l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante (25° ± 1°C).
11. Au bout de ces 30 minutes après l'addition de substrat, ajouter 50 µl (0,05 ml) de la solution blocante dans chaque puits en procédant à un rythme régulier et rapide sans interruption.
12. Remettre à zéro le lecteur de la plaque et lire l'absorbance de la plaque à 405 nm. Les puits A1 et B1 peuvent être utilisés pour remettre à zéro le lecteur de la plaque. Ils ne contiennent pas d'échantillon, donc pas de conjugué, seulement un réactif de substrat et une solution blocante.
13. Calculer les données conformément aux instructions de la section X.

X. CALCUL DES DONNÉES

Pour les calculs manuels, préparer une courbe dose-réponse sur du papier millimétré, en reportant chaque valeur étalon (indiquée sur l'étiquette du flacon étalon) sur l'axe X et la valeur d'absorbance correspondante sur l'axe Y. Tracer une ligne qui représente la ligne droite la plus adéquate entre les trois points. Déterminer la valeur GAD du sérum de chaque patient à l'aide de sa valeur d'absorbance et en extrapolant à partir de la courbe dose-réponse sur l'axe X.

Dans les calculs automatiques, l'absorbance de l'échantillon de sérum de chaque patient doit être convertie en valeurs GAD à l'aide d'un programme informatique permettant de trouver la meilleure régression linéaire. Saisir les valeurs GAD indiquées sur chaque étiquette des étalons à titre de normes. Les valeurs sont exprimées en unités/ml établies par Biomerica.

La valeur GAD de chaque échantillon est interprétée de la façon suivante :

<u>Valeur GAD (U/mL)</u>	<u>Résultat</u>
<1,00	Négatif
>1,05	Positif
1,00-1,05	Indéterminé (valeur limite)

Un résultat positif (>1,05) implique la présence d'auto-anticorps anti-GAD dans l'échantillon de sérum du patient. Un résultat négatif (<1,00) signifie l'absence d'auto-anticorps anti-GAD ou une quantité inférieure à la limite de résolution du test. Si le résultat est une valeur indéterminée (valeur limite) entre 1,00 et 1,05, l'échantillon doit être testé de nouveau. Si le test répété

indique une valeur négative, l'échantillon doit être considéré négatif. Si au contraire le résultat du test répété est positif, traiter l'échantillon du sérum comme étant positif. Si, après avoir répété le test, on obtient une valeur limite, effectuer ultérieurement le test sur un autre échantillon, selon les instructions du médecin.

EXEMPLES DE DONNÉES DE TEST ISLETEST™-GAD

Section A : Valeurs étalon et résultats de contrôle

Contrôles	DO moyenne	Valeur GAD	Résultat
Étalon n° 1	0,346	0,613	
Étalon n° 2	0,634	1,124	
Étalon n° 3	1,687	2,991	
Contrôle négatif	0,188	0,32	-
Contrôle positif	1,24	2,2	+

REMARQUE : Ne pas utiliser ces données pour des valeurs expérimentales réelles. Il s'agit seulement d'un exemple.

Valeur GAD : Négatif < 1,00 U/ml
 Positif > 1,050 U/ml
 Indéterminé 1,00 -1,050 U/ml
 (valeur limite)

Les unités sont établies par Biomerica

Section B : Résultats de l'échantillon du patient

Échantillon	DO moyenne	Valeur GAD	Résultat
1	0,375	0,664	-
2	0,273	0,484	-
3	0,662	1,173	+

XI. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Les contrôles négatif et positif doivent être effectués à chaque fois avec des échantillons inconnus pour assurer la validité des résultats. Le contrôle négatif doit présenter une valeur < 1,0 Unités/ml et le contrôle positif doit être > 1,0 Unités/ml.

XII. PERFORMANCES

Réactivité croisée

Pas d'interférence notable des facteurs d'AAN, d'ADN et rhumatoïdes. Les échantillons de sérum avec des auto-anticorps anti-Tg et anti-TPO n'ont montré qu'une faible ou aucune réactivité croisée.

Précision

La fiabilité du test ELISA Isletest-GAD de Biomerica a été évaluée en observant sa reproductibilité avec des échantillons cliniques confirmés d'auto-anticorps anti-GAD.

Intra-dosage (même test)

Échantillon	N	Valeur GAD moyenne	Déviations standard	% C.V.(coefficient de variation)
1	20	0,560	0,038	5,4
2	20	1,771	0,035	4,8

Inter-dosage (divers tests)

Échantillon standard	N	Valeur GAD moyenne		Déviations
	% C.V.(coefficient de variation)			
1	10	0,424	0,074	4,6
2	10	1,542	0,040	4,5

Spécificité et sensibilité

99 échantillons de sérum de patient confirmés ont été testés pour les auto-anticorps anti-GAD. 39 de ces échantillons ont été confirmés négatifs et les 60 autres positifs. La table ci-après présente les résultats des tests ELISA Isletest-GAD sur les échantillons :

Nombre total d'échantillons testés	Total Négatif ¹	Total Positif ²	Faux Positif ³	Faux Négatif ⁴
99	34	51	5	9

- (1) Négatif avec les deux tests, ELISA Isletest-GAD et le test de référence
- (2) Positif avec les deux tests, ELISA Isletest-GAD et le test de référence
- (3) Positif avec le test, ELISA Isletest-GAD et négatif avec le test de référence
- (4) Négatif avec le test ELISA Isletest-GAD et positif avec le test de référence

Exactitude exprimée en pourcentage : 85,8 %

spécificité : 87,1 % sensibilité : 85,0 %

Récupération

Des recherches de récupération ont été effectuées avec le test ELISA Isletest GAD sur des échantillons de sérum précédemment confirmés ayant des valeurs connues d'auto-anticorps anti-GAD.

Auto-anticorps ajouté (Valeur GAD)	Auto-anticorps récupéré (Valeur GAD)	% de récupération
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. LIMITES ET SOURCES D'ERREUR









1. Même si un titre GAD plus élevé produit une lecture de DO plus élevée, le test est prévu pour la détermination semi-quantitative des auto-anticorps anti-GAD dans des échantillons de sérum pour test.
2. Une mauvaise reproductibilité des tests peut être due à :
 - a. une technique d'administration irrégulière des réactifs
 - b. une mauvaise conservation des réactifs
 - c. une mauvaise reconstitution des réactifs
 - d. un lavage incomplet des micropuits
 - e. un réactif de substrat trop usé ou exposé à la lumière
 - f. un spectrophotomètre instable ou défectueux
 - g. une erreur de procédure de dosage

XIV. RÉFÉRENCES

1. Cooke, A. (1990). An overview on the possible mechanism of destruction of the insulin-producing beta cell. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **164**:125-142.
2. Harrison, L.C., I.L. Campbell, P.G. Colman, et al (1990). Type 1 diabetes: Immunology and Immunotherapy. *Adv. Endocrinol. Metab.* **1**:35-94.
3. Bottazzo, G.F., A. Florin-Christensen, and D. Doniach (1974). Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, **ii**:1279-1283.

4. 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.
5. Baekkeskou, S., J.H. Nielson, and B. Marner, et al. (1982). Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature*, **298**:167-169.
6. Palmer, J.P., C.M. Aspin, P. Clemons, et al. (1983). Insulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment. *Science*, **222**:1337-1339.
7. Erlander, M.G. and A. J. Tobin (1991). The structure and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem. Res.*, **16**:215-226.
8. 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.
9. Christgau, S., H. Schierbeck, H.J. Aunstoost, 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.
10. Clare-Salzler, M.J., A.J. Tobin, and D.L.O. Kaufman (1992). Glutamate decarboxylase: an autoantigen in IDDM. *Diabetes Care*, **15**:132-135.
11. 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.
12. Kim, J., W. Richter, H.J. Aanstoot, 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.
13. 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.
14. Komalesh, M., A. Karasik, and S. Srikanta (1986). Islet cell antibodies as predictors of insulin-dependent diabetes mellitus. *Pract. Cardiol.*, **12**:79-91.

XV. SYMBOLES

	Température de conservation
	Code de fournée
	Expiration
	Fabricant
	Agent agréé
	Précaution, voir des instructions
	Pour un diagnostic in vitro
	N° de catalogue

XVI. COMMANDE DE PRODUITS

COMMANDES : Envoyer les commandes à :



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

2°C / 8°C



Téléphone : (949) 645-2111
Fax : (949) 553-1231
Site Web : www.biomerica.com
E-mail : bmra@biomerica.com
67009-05_fre.doc





février 2018

conformément à la directive 98/79/ de la CE sur les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover
Allemagne