

# Isletest™-GAD

REF 7009

## Test ELISA qualitativo per l'identificazione di autoanticorpi circolanti contro gli antigeni GAD

febbraio 2018



### I. USO PREVISTO

L'Isletest-GAD è un test ELISA qualitativo *in vitro* mirato all'identificazione degli autoanticorpi circolanti contro l'antigene GAD (acido glutammico decarbossilasi), sia in soggetti pre-diabetici ad alto rischio sia in pazienti diabetici IDDM.

### II. PRELIMINARI

Il diabete mellito insulino-dipendente (IDDM), classificato come "tipo 1", è caratterizzato dalla distruzione delle beta-cellule pancreatiche causata da un processo autoimmune (1, 2). Questa patogenesi autoimmunitaria di tipo selettivo inibisce completamente la secrezione insulinica. L'evidenza immunologica è stata dimostrata dalla presenza, nel siero di un paziente IDDM, di specifici anticorpi nelle isole pancreatiche. Nei pazienti diabetici di "tipo 1" sono stati identificati almeno tre autoanticorpi diretti verso alcuni antigeni delle isole pancreatiche, nello specifico le componenti antigene delle isole (4), l'acido glutammico decarbossilasi (5) e l'insulina (6).

L'acido glutammico decarbossilasi (GAD) è l'enzima biosintetico del gamma-amminobutirrato (GABA), un amminoacido neurotrasmettitore con proprietà inibitrici (7). Le due manifestazioni del GAD, 65 Kda e 67 Kda, sono prodotte da un unico gene e caratterizzate da un'elevata omogeneità (8-10). I GAD 65 Kda e 67 Kda sono stati identificati nelle cellule cerebrali e nelle isole pancreatiche; nel pancreas, il GAD si manifesta in maniera diversa nei soggetti umani rispetto a come avviene nei ratti e nei topi (11,12).

Il diabete è una malattia autoimmune cronica nella quale il sistema immunitario attacca e distrugge le beta-cellule pancreatiche, pertanto l'identificazione precoce e accurata dell'esordio della malattia in stadio pre-clinico (asintomatico) mira ad intervenire sul processo distruttivo, al fine di preservare interamente la massa funzionante delle cellule b-pancreatiche. Lo screening delle popolazioni ad alto rischio per l'identificazione dei tre autoanticorpi (ICA, IAA e GAD) potrà prevenire o rallentare lo scatenarsi del quadro clinico. Popolazioni ad alto rischio (asintomatiche) positive a due o più autoanticorpi sono più predisposte allo sviluppo del diabete mellito insulino-dipendente, generalmente nell'ordine di 5-7 anni successivi allo screening (13, 14).

### III. PRINCIPIO DEL TEST

Un antigene GAD purificato viene immobilizzato in micropozzetti e quindi reagisce immunologicamente con gli anticorpi IgG CAD-specifici presenti nel siero del paziente. Dopo la rimozione tramite lavaggio delle proteine sieriche in esubero o non legate, il complesso GAD-anticorpo è associato per fosfatasi alcalina con un enzima (anticorpo di capra) specifico dell'IgG umana. Una volta eliminato il coniugato enzimatico non reagente dai pozzetti, viene aggiunto un substrato (PNPP) e il colore generato viene misurato per spettrofotometria. L'intensità cromatica che si genera è direttamente proporzionale alla concentrazione di autoanticorpi GAD presenti nel campione sierico. I controlli GAD-positivo e negativo fungono da controllo della qualità interno per la convalida dei risultati.

### IV. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

#### 1. Materiali dal potenziale rischio biologico

I calibratori ed i controlli sono costituiti da siero umano, il quale è stato analizzato con reagenti approvati dall'ente FDA (Food and Drug Administration) e ritenuto non reattivo nei test per l'antigene di superficie dell'epatite B (HbsAg), HIV-2 e HCV. Dal momento che nessun test è in grado di offrire assoluta certezza in merito all'assenza di agenti infettivi, quali HIV, epatite B virale, questi reagenti devono essere trattati come potenzialmente in grado di trasmettere infezioni.

#### 2. Azotidrato di sodio

Alcuni reagenti possono contenere azotidrato di sodio come conservante, il quale può reagire con il piombo, il rame o l'ottone dando luogo alla formazione di azotidrati metallici dal potenziale esplosivo. Per eliminare questi materiali, irrorare le tubature con grossi volumi di acqua per evitare l'accumulo di azotidrato.

#### 3. Soluzione di arresto

La soluzione bloccante è un composto di 1N HaOH, una base forte che va trattata con particolare cautela. Indossare un paio di guanti occhiali e indumenti di protettivi per maneggiare il materiale. Non inalarlo e diluire i versamenti con l'acqua prima di assorbirli con carta da cucina.

#### 4. Soluzione substrato

Soluzione substrato è costituita da para-Nitrofenilfosfato (PNPP), un substrato cromogenico non proteinico utilizzato in questo test ELISA. A volte il substrato può mostrare un colore giallastro. Questo colore non interferirà con i risultati del test.

#### Precauzioni

1. Non congelare i reagenti del test; conservare tutti i componenti del kit a 2 ~ 8°C.
2. I controlli positivo e negativo devono essere eseguiti nuovamente ad ogni ripetizione del test.
3. Come campioni per il test, utilizzare solamente siero trasparente, non torbido, in assenza di emolisi o contaminazioni microbiche.
4. Tutti i campioni devono essere analizzati in duplicato.
5. Non mescolare reagenti prelevati da partite di prodotto diverse.
6. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.

- Non conservare i reagenti a temperatura ambiente per periodi prolungati.
- Non esporre la soluzione substrato alla luce.
- Adottare un'attenta tecnica di pipettazione per garantire riproducibilità e accuratezza dei dati.

## V. REAGENTI E MATERIALI

### Materiali in dotazione

- PLA GAD** = Strisce per micropozzetto GAD (con contenitore)..... 12 unità
- CONJ ENZ 6X** = Coniugato enzimatico GAD (concentrato) ..... 2 x 1,0 ml
- DIL SPE 5X** = Diluente per campione Isletest (concentrato) ..... 1 x 25,0 ml
- CONJ ENZ DIL** = Diluente per coniugato Isletest ..... 1 x 10,0 ml
- CAL GAD 1-3** = Calibratori GAD (1,2,3) (siero umano)..... 1 x 1,5 ml
- CTRL - GAD** = Controllo negativo GAD (siero umano) ..... 1 x 1,5 ml
- CTRL + GAD** = Controllo positivo GAD (siero umano) ..... 1 x 1,5 ml
- SUBS PNPP** = Soluzione di substrato Isletest (PNPP) ..... 1 x 15,0 ml
- BUF WASH 25X** = Tampone di lavaggio Isletest (concentrato) . 1 x 20,0 ml
- SOLN STP** = Soluzione bloccante Isletest (1N HaOH)..... 1 x 6,0 ml

## VI. ALTRI MATERIALI OCCORRENTI (NON IN DOTAZIONE)

- Acqua distillata o deionizzata.
- Carta assorbente per asciugare le strisce dopo il lavaggio e pellicola di plastica per sigillare le strisce durante l'incubazione.
- Provette di vetro di misura adatta per la diluizione del siero.
- Micropipetta con punte usa e getta per dispensare 10 µl, 50 µl e 100 µl.
- Lavatore per piastre microtiter o flacone morbido per il lavaggio.
- Pipette da 5 ml per il diluente del coniugato.
- Un cilindro graduato da 500 ml.
- Lettore per piastre microtiter con capacità di assorbanza a 405 nm.
- Etichette di plastica adesive per proteggere i pozzetti inutilizzati prima dell'analisi.

## VII. RACCOLTA DEL CAMPIONE

Con una siringa, prelevare 5 ~ 10 ml di sangue e raccoglierlo in una fiala (sommità di colore rosso), avvalendosi eventualmente di separatori per il siero. Separare il siero per centrifugazione. I campioni di siero devono essere conservati a 2 ~ 8°C. Un'eccessiva emolisi e la presenza di grossi coaguli o di crescita microbica nel campione possono interferire con la conduzione del test. Congelare il siero a -20°C se non si prevede di analizzarlo entro le successive 24 ore.

## VIII. PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

### 1. Ricostituzione del coniugato enzimatico GAD

Con dosaggio preciso, trasferire 5 ml di diluente per coniugato in un flacone contenente 1,0 ml di coniugato enzimatico (concentrato). Chiudere il tappo e mescolare agitando il flacone più volte per inversione. Conservare il coniugato diluito a 2 ~ 8°C quando non è in uso. Annotare la data della ricostituzione sull'etichetta del flacone. **Il reagente così diluito è stabile per un massimo di 30 giorni dalla ricostituzione.** Il contenuto di un flacone è sufficiente per sei strisce di test. Ricostituire un altro coniugato secondo necessità.

### 2. Tampone diluente per campione Isletest

Se precipitano è presente nel concentrato di diluente per campione a causa di archiviazione di temperatura più bassa, come ad esempio 2-8°C, sciogliere ponendo la provetta a bagnomaria a 37°C per 30 minuti. Trasferire l'intero contenuto (25 ml) in un contenitore adatto con 100 ml di acqua distillata/deionizzata. Mescolare abbondantemente; applicare un'etichetta al contenitore per indicare il contenuto (diluente campione Isletest) e conservarlo a 2 ~ 8°C. Il reagente diluito è stabile sino alla data riportata sulla provetta. Si noti che il precipitato visto nel concentrato non ha alcun effetto sulle prestazioni del test e non sarà presente in 1X diluente per campione.

### 3. Tampone di lavaggio Isletest

In presenza di cristalli nel tampone di lavaggio concentrato, dovuti a conservazione a temperature inferiori (es. 2-8°C), dissolvere ponendo la provetta in un bagno ad acqua o in una incubatrice a 37°C per 30 minuti. Trasferire l'intero contenuto in un contenitore capiente con 480 ml di acqua distillata/deionizzata. Mescolare abbondantemente; affiggere un'etichetta al contenitore e conservarlo a 2 ~ 8°C. Il reagente diluito è stabile sino alla data riportata sulla provetta.

### 4. Preparazione del campione sierico

Con dosaggio preciso, pipettare 10 µl di campione sierico in 1,0 ml di diluente per campione, in una provetta di vetro già dotata di etichetta e mescolare abbondantemente.

## IX. PROCEDURA DI ANALISI

Il kit del test contiene 12 strisce per micropozzetto rivestite di antigene GAD purificato. Il numero di strisce utilizzate in ogni saggio dipende dal numero di campioni da analizzare. Se si utilizzano tutte e 12 le strisce, questo test consente di analizzare un totale di 42 campioni di siero in duplicato.

**NOTA IMPORTANTE** – Portare tutti i reagenti, compresi i campioni sierici, a temperatura ambiente (25°C) prima della seduta analitica. Temperature di incubazione con escursioni superiori a  $\pm 1^\circ\text{C}$  possono compromettere i risultati.

- Distribuire nel contenitore fornito il numero di strisce necessario alla seduta analitica. Fissare saldamente ogni striscia per evitare che possa cadere e frantumarsi.
- Prendere conoscenza del sistema di numerazione dei pozzetti, A1, B1, C1, D1, ecc., quindi applicare un'etichetta alle strisce e con un pennarello annotare su ciascuna il numero di pozzetto corrispondente.
- Dispensare 100 µl di calibratori (controlli positivo e negativo) e di campioni sierici diluito nei micropozzetti appropriati. I pozzetti A1 e B1 rimangono vuoti per i bianchi e non contengono il campione.
- Sigillare la piastra con la pellicola di plastica per impedire la contaminazione e incubare per un'ora a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ).
- Scaduto il periodo di incubazione di un'ora, versare il contenuto nei micropozzetti e asciugare la piastra tamponandola delicatamente con carta assorbente. Se si utilizza un lavatore automatico per piastre, lavare tutti i pozzetti 3 volte con 300 µl di soluzione tamponata di lavaggio. Se si utilizza un flacone morbido, riempire attentamente i pozzetti con il tampone di lavaggio e quindi svuotarli del contenuto. Evitare che si formino bolle d'aria nei

- pozzetti durante il lavaggio. Ripetere questa procedura altre due volte (per un totale di 3 volte). Dopo ciascun lavaggio, tamponare la piastra con carta assorbente per asciugarla.
- Aggiungere 100 µl di reagente coniugato enzimatico ricostituito (v. passaggio 1, Sezione VIII – Preparazione del reagente) a tutti i pozzetti tranne A1 e B1.
  - Sigillare la piastra con pellicola di plastica e incubare **al buio** per un'ora a temperatura ambiente (25°C ± 1°C).
  - Dopo l'incubazione, lavare tutti i micropozzetti 3 volte nel modo descritto in precedenza (v. passaggio 5).
  - Aggiungere 100 µl di substrato a tutti i pozzetti tranne A1 e B1. Dispensare velocemente il reagente substrato senza esitazioni. A volte il substrato può mostrare un colore giallastro. Questo colore non interferirà con i risultati del test.
  - Coprire la piastra e lasciarla al buio per 30 minuti a temperatura ambiente (25° ± 1°C).
  - Scaduti i 30 minuti, aggiungere 50 µl di soluzione bloccante a ciascun pozzetto, con movimento rapido e deciso.
  - Azzerare il lettore e leggere il valore di assorbanza a 405 nm. I pozzetti A1 e B1 sono predisposti come bianchi per il lettore poiché non contengono campione né coniugato, ma solamente substrato e soluzione bloccante.
  - Calcolare i dati in base ai principi esposti nella sezione X.

## X. CALCOLO DEI DATI

Per i calcoli manuali, tracciare una curva di risposta alla dose (DRC) su carta a scala lineare, rappresentando ciascun valore del calibratore (indicato sull'etichetta della provetta) sull'asse delle ascisse e il corrispondente valore di assorbanza sull'asse delle ordinate. Disegnare una linea che rappresenti la retta ottimale passante per i tre punti. Stabilire il valore GAD del siero di ciascun paziente sulla base del rispettivo valore di assorbanza, estrapolandolo dall'asse X della curva DRC.

Per i calcoli automatici, il valore di assorbanza del siero di ciascun paziente deve essere convertito in un valore GAD avvalendosi di un programma per computer che possa eseguire analisi della regressione lineare sulla base della tecnica dei quadrati medi. I valori GAD indicati sull'etichetta dei calibratori devono essere utilizzati come standard (espressi in unità/ml secondo specifica Biomerica).

Il valore GAD di ciascun campione va interpretato alla luce dei criteri seguenti:

Valore GAD ( U/mL)	Risultato
<1,00	Negativo
>1,05	Positivo
1,00 ~ 1,05	Indeterminato (al limite)

Un risultato positivo (>1,05) indica la presenza di autoanticorpi GAD nel campione sierico del paziente. Per contro, un risultato negativo (<1,00) indica l'assenza di autoanticorpi GAD ovvero una loro presenza sotto ai limiti di risoluzione del test. Se si ottiene un valore al limite (indeterminato) (1,00 ~ 1,05), è bene ripetere il test. Se anche il test ripetuto ha un valore negativo, il campione sierico deve essere considerato negativo. Se il test ripetuto ha un valore positivo, il campione va considerato positivo. Se invece si ottiene nuovamente un valore al limite anche ripetendo il test, si consiglia di lasciare trascorrere qualche tempo e quindi di prelevare un altro

campione per ripetere il test nel rispetto delle istruzioni fornite dal medico.

## DATI CAMPIONE ISLETTEST™-GAD

Sezione A: valori del calibratore e risultati di controllo

Controlli	OD media	Valore GAD	Risultato
Calibratore 1	0,346	0,613	
Calibratore 2	0,634	1,124	
Calibratore 3	1,687	2,991	
Controllo negativo	0,188	0,32	-
Controllo positivo	1,24	2,2	+

**NOTA** – Non utilizzare questi dati di esempio come valori effettivi della sperimentazione.

Valore GAD: Negativo	<1,00 U/ml
Positivo	>1,05 U/ml
Indeterminato	1,00 ~ 1,05 U/ml (al limite)

Le unità sono intese da specifica Biomerica

Sezione B: risultati del campione paziente

Campione	OD media	Valore GAD	Risultato
1	0,375	0,664	-
2	0,273	0,484	-
3	0,662	1,173	+

## XI. CONTROLLO QUALITÀ

La validità dei risultati è assicurata soltanto se parallelamente ai campioni sconosciuti vengono eseguiti i controlli positivo e negativo. Il controllo negativo deve avere un valore <1,0 unità/ml mentre quello positivo >1,0 unità/ml.

## XII. CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA

### Reattività incrociata

Non è stata osservata interferenza rilevante da ANA, DNA e fattori reumatoidi. I campioni sierici con autoanticorpi anti-Tg e anti-TPO non hanno manifestato alcuna reattività incrociata, o comunque di livello irrilevante.

### Precisione

L'affidabilità del test ELISA Isletest-GAD di Biomerica è stata valutata alla luce della sua riproducibilità, utilizzando campioni clinici in cui era stata confermata la presenza dell'autoanticorpo GAD.

#### Intra-saggio (all'interno di un'analisi)

Campione	N	Valore GAD medio	DS	%CV
1	20	0,560	0,038	5,4
2	20	1,771	0,035	4,8

#### Inter-saggio (tra due analisi)

Campione	N	Valore GAD medio	DS	%CV
1	10	0,424	0,074	4,6
2	10	1,542	0,040	4,5

### Specificità e sensibilità

Il test degli autoanticorpi GAD è stato eseguito su 99 campioni sierici confermati. Tra i campioni esaminati, 39 si sono confermati negativi, mentre i restanti 60 si sono confermati positivi. I risultati

del test ELISA Isletest-GAD sui campioni sono riportati nella tabella seguente.

N. totale di campioni testati	N. totale negativi <sup>1</sup>	N. totale positivi <sup>2</sup>	Falsi positivi <sup>3</sup>	Falsi negativi <sup>4</sup>
99	34	51	5	9

- (1) Negativi nel test ELISA Isletest-GAD e nel test di riferimento  
 (2) Positivi nel test ELISA Isletest-GAD e nel test di riferimento  
 (3) Positivi nel test ELISA Isletest-GAD e negativi nel test di riferimento  
 (4) Negativi nel test ELISA Isletest-GAD e positivi nel test di riferimento

Accuratezza: 85,8% Specificità: 87,1%

Sensibilità: 85,0%

### Recupero

Gli studi sul recupero sono stati condotti con il test ELISA Isletest-GAD utilizzando campioni sierici per i quali erano già stati confermati valori noti di autoanticorpo GAD.

Autoanticorpo aggiunto (valore GAD)	Autoanticorpo recuperato (valore GAD)	Recupero
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. LIMITAZIONI E FONTI DI ERRORE

- Benché un titer GAD più elevato produca una lettura OD maggiore, il test è stato studiato per la determinazione semi-quantitativa degli autoanticorpi GAD nei campioni sierici in esame.
- Le cause di una scarsa riproducibilità sono da ricercarsi tra i fattori indicati di seguito.
  - Dispensazione incostante dei reagenti
  - Conservazione inadeguata dei reagenti
  - Ricostituzione erronea dei reagenti
  - Lavaggio incompleto dei micropozzetti
  - Reagente substrato scaduto o esposto alla luce
  - Spettrofotometro instabile o difettoso
  - Errore nella procedura di analisi

### XIV. BIBLIOGRAFIA

- 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. Marner, et al. (1982). Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature*, **298**:167-169.
- Palmer, J.P., C.M. Aspin, 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. Aanstoot, 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. 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.
- 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. SIMBOLI

	Temperatura di conservazione
	Codice di lotto
	Scadenza
	Fabbricante
	Rappresentante autorizzato
	Attenzione, vedere le istruzioni
	All'impiego diagnostico in vitro
	n. ° de Catálogo

### XVI. INFORMAZIONI PER L'ORDINAZIONE

ORDINAZIONE – Inviare un ordine d'acquisto al seguente indirizzo:

 BIOMERICA, INC. 2°C/8°C  
 17571 Von Karman Avenue  
 Irvine, California 92614   
 U.S.A.  
 Telefono: +1 949 645 2111  
 Fax: +1 949 553-1231   
 URL: www.biomerica.com  
 E-mail: bmra@biomerica.com

67009-05\_ita.doc

febbraio 2018

  
 secondo IVDD 98/79/CE  
 MDSS GmbH  
 Schiffgraben 41  
 D-30175 Hannover  
 Germania