

















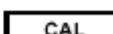

# CentAK® anti-GAD<sub>65</sub> MODE D'EMPLOI

50 Tests - REF 1720  
100 Tests REF 1700



Test direct de radioliation pour le dosage des anticorps anti-acide-glutamique-décarboxylase dans le sérum ou dans le plasma EDTA

**MEDIPAN GMBH**  
Ludwig-Erhard-Ring 3  
**15827 Dahlewitz / Berlin (Germany)**  
...  
Phone: +49(0)33 708 / 44 17 - 0  
Fax: +49(0)33 708 / 44 17 - 25  
  
info@medipan.de  
www.medipan.com

IFU symbols radioactive assays MEDIPAN GMBH			
 IVD	Dispositif de diagnostic in vitro	 CE	Déclaration de conformité CE
 REF	Référence catalogue	 LOT	Numéro de lot
	Date de péremption		Fabriqué par
	Se référer aux documents		Consulter le mode d'emploi
	A stocker à		Risque biologique
	Composant radioactif		
 TRAC	Traceur	 BUF D	Tampon
 CONTROL	Contrôle sérum	 CAL	Standards
 PRE	Suspension de protéine A		

## INTRODUCTION

Le diabète de type 1, aussi connu sous le nom de diabète insulino-dépendant (DID), résulte d'une destruction auto-immune chronique des cellules bêta du pancréas sécrétant l'insuline, probablement initiée par un facteur de l'environnement chez un hôte génétiquement prédisposé. La destruction auto-immune des cellules bêta est présumée être de nature asymptomatique jusqu'à ce que 80 à 90% des cellules soient perdues. Ce processus peut mettre des années à se mettre en place et peut apparaître à l'âge de la vie.

Durant la phase pré-clinique, ce processus auto-immun est marqué par la présence dans la circulation d'anticorps dirigés contre des antigènes des cellules bêta. Ces anticorps sont présents des années avant le début du diabète de type 1 et des symptômes cliniques. Les études antérieures utilisaient des tests d'immunofluorescence qui détectent les anticorps dirigés contre les îlots de Langerhans (ICA). Ces tests ont été difficiles à standardiser. Ils sont maintenant remplacés par la combinaison de différents tests radioimmunologiques pour le dosage d'anticorps reconnaissant spécifiquement des antigènes des cellules bêta, comme l'insuline (IAA), la glutamate décarboxylase (GAD) et la tyrosine phosphatase ICA 512 (GAD<sub>65</sub>).

La GAD, l'enzyme qui catalyse la conversion du glutamate en GABA, existe sous deux isoformes de poids moléculaires 65000 (GAD<sub>65</sub>) et 67000 (GAD<sub>67</sub>). Les anticorps anti-GAD<sub>65</sub> sont présents dans le diabète de type 1 et dans une neuropathie grave, le syndrome de l'homme raide (SHR). Toutefois, les profils sérologiques des anti-GAD<sub>65</sub> sont différents dans ces deux pathologies.

Les anticorps rencontrés chez les patients atteints du SHR reconnaissent une combinaison d'épitopes linéaires et conformationnels tandis que chez les diabétiques, les anti-GAD<sub>65</sub> sont majoritairement dirigés contre les épitopes conformationnels. **Les anticorps anti-GAD<sub>65</sub> sont présents chez 70 à 80% des diabétiques de type 1 au moment du diagnostic** et peuvent être détectés plusieurs années avant l'apparition des signes cliniques de la maladie.

La combinaison des tests de dosage des anticorps anti-GAD<sub>65</sub> et anti-GAD<sub>67</sub> est très significative de l'évaluation du risque d'un diabète de type 1 chez les enfants et les adolescents. Le dépistage des anticorps anti-GAD<sub>65</sub> et anti-GAD<sub>67</sub> détecte plus de 90% des sujets à risque pour le diabète de type 1 et de ce fait a les qualités nécessaires pour remplacer le test d'immunofluorescence des anticorps dirigés contre les îlots.

Les anticorps anti-GAD<sub>65</sub> peuvent également être mis en évidence chez certains adultes atteints de diabète de type 2. Ces patients qui ont en commun une hyperglycémie sévère, deviennent progressivement insulino-dépendants après plusieurs mois voire quelques années de traitement avec des hypoglycémisants oraux. On pense que ces malades ont une forme de diabète de type 1 à évolution progressive et cette affection est parfois appelée diabète à marche lente de l'adulte (LADA). La présence d'anticorps anti-GAD<sub>65</sub> dans le sérum de ces patients constitue un marqueur sensible et spécifique d'une évolution vers l'insulino-dépendance.

## PRINCIPE DU DOSAGE

CentAK anti-GAD<sub>65</sub> est un dosage direct basé sur le principe des tests de radioliation. La GAD<sub>65</sub> recombinante humaine est hautement purifiée et marquée à l'iode 125. Ce traceur est utilisé en excès et se fixe sur les anticorps anti-GAD<sub>65</sub> de l'échantillon.

Le traceur du CentAK anti-GAD<sub>65</sub> répond aux plus hautes exigences quant à la pureté, l'identité enzymologique, les cinétiques de réactions rapides, à l'absence de réaction croisée et à la stabilité. Ce sont les conditions indispensables pour une reconnaissance et une fixation spécifiques du traceur par les anticorps anti-GAD<sub>65</sub> de l'échantillon.

En ajoutant de la protéine A (*Staph. aureus*) qui se fixe sur le fragment Fc des anticorps, il y a formation d'un complexe de type sandwich. Cette étape facilite la séparation de la fraction liée (B) par centrifugation. Après avoir décanté le surnageant contenant la fraction libre du traceur, la radioactivité du précipité obtenu est mesurée.

Le signal radioactif (cpm) de la fraction liée (B) est directement proportionnel à la concentration en anticorps anti-GAD<sub>65</sub> dans l'échantillon.

Aucun complexe immunitaire n'est obtenu si les anticorps anti-GAD<sub>65</sub> ne sont pas présents dans l'échantillon, puisque le traceur ne se fixe qu'aux anticorps anti-GAD<sub>65</sub> et non à la protéine A.

Une courbe d'étalonnage avec une gamme de 0,1 – 120 (300) U/ml est établie en mesurant les cpm (%B/T) des standards 1 à 6 (7). Les concentrations en anticorps anti-GAD<sub>65</sub> des patients sont directement lues à partir de la courbe standard.

## ECHANTILLONS DES PATIENTS


### Prélèvement et conservation des échantillons

Le sang est prélevé par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum est récupéré par centrifugation. Le plasma peut aussi être utilisé avec le kit CentAK anti-GAD<sub>65</sub>. Éviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou lipidiques.

Les échantillons peuvent être conservés à 2 – 8 °C jusqu'à 3 jours. Pour un stockage prolongé, il est préférable de les stocker à -20 °C.

Éviter les congélations/décongélations répétées. Dans le cas d'utilisations multiples, aliquoter les échantillons et les stocker à -20 °C.

## Composition du kit pour 100 (50) dosages

D	Traceur (125I-GAD <sub>65</sub> humain recombinant)		2 (1) flacons lyophilisés, reconstitution : 2,6 ml de J, chacun
	< 50 kBq		
	<b>TRAC</b>		
J	Tampon (Pour la reconstitution des composants D et L)		1 flacon, 120 ml, prêt à l'emploi
	<b>BUF D</b>		
L	Protéine A en suspension		2 (1) flacons lyophilisés, reconstitution : 2,6 ml de J, chacun
	<b>PRE</b>		
1 - 7	Standards ANTI-GAD <sub>65</sub> (sérum humain) Conc : 0,1 ; 1,0 ; 3,0 ; 10 ; 30 ; 120 U/ml (300 U/ml en option)		7 Flacons : 0,15 ml chacun, prêts à l'emploi
	<b>CAL</b>		
CI - CII	Sérums de contrôle anti-GAD <sub>65</sub> (sérum humain) Conc. : se reporter à la fiche jointe		2 flacons : 0,15 ml, chacun, prêts à l'emploi
	<b>CONTROL</b>		

### Format et conservation

CentAK anti-GAD<sub>65</sub> a été conçu pour 100 ou 50 déterminations. Il permet l'analyse de 41 ou 16 échantillons inconnus, la réalisation de la gamme d'étalonnage et la détermination des contrôles en double.

La date de validité de chaque réactif est indiquée sur l'étiquette correspondante et rapportée sur l'étiquette du coffret.

A réception du coffret, tous les composants du CentAK anti-GAD<sub>65</sub> doivent être conservés à 2 – 8 °C, de préférence dans son emballage d'origine.

## Préparation avant l'emploi

Porter tous les composants du kit à température du laboratoire avant utilisation pour le dosage.

D Traceur :  
Reconstituer avec 2,6 ml de J. Le traceur reconstitué demeure stable pendant 2 semaines à 2 – 8 °C.

J Tampon :  
BUFD est prêt à l'emploi et permet la reconstitution du traceur et de la suspension de protéine A. Il est également utilisé pour l'étape de lavage.

L Suspension de protéine A :  
Reconstituer avec 2,6 ml de J. La suspension reconstituée demeure stable pendant 2 semaines à 2 – 8 °C.  
Note : La suspension de protéine A tend à précipiter, il est conseillé d'agiter doucement le flacon pendant 10 à 20 secondes, **immédiatement avant utilisation**.

1 – 5 Standards : Prêts à l'emploi.

En routine la courbe d'étalonnage est préparée avec les standards 1 à 6 (0,1 – 120 U/ml). Lorsque l'on s'attend à des titres très élevés en anticorps, on complétera la courbe avec le standard 7 (300 U/ml).

CI – CII Sérums de contrôle : Prêts à l'emploi.

## PROTOCOLE DE DOSAGE

Utiliser uniquement des tubes coniques pour le centAK anti-GAD<sub>65</sub>.

1. Numérotter les tubes de façon appropriée.
2. Distribuer dans les tubes correspondants au schéma
  - 20 µl de standards ou
  - 20 µl sérum de contrôle ou
  - 20 µl des échantillons sériques des patients
3. Ajouter 50 µl de traceur (préparé à partir de D et J) dans tous les tubes, **y compris ceux pour la radioactivité totale (tubes T)**. Les tubes T sont maintenant à mettre de côté jusqu'à la mesure de la radioactivité.
4. Incuber 2 heures à température ambiante.
5. Ajouter 50 µl de la suspension de protéine A (préparée à partir de J et L) dans chaque tube.

(Agiter la suspension doucement avant l'utilisation, se référer à la section préparation avant l'emploi)

6. Incuber 60 minutes (à température ambiante).
7. Ajouter 1 ml de tampon (J) dans chacun des tubes.
8. Centrifuger les tubes pendant 20 minutes à une vitesse minimum de 1500 x g.
9. Aspirer le surnageant complètement ou décanter. Pour éliminer les gouttelettes résiduelles, laisser reposer les tubes retournés (5 à 10 minutes) sur du papier absorbant en tapotant légèrement.
10. Mesurer la radioactivité de tous les tubes y compris des tubes T. Temps de comptage recommandé : 1 minute.

## EXPLOITATION DES DONNEES

Pour de meilleurs résultats nous recommandons d'utiliser une transformation log/log.

La courbe d'étalonnage est établie en reportant les valeurs moyennes en cpm des standards 1 – 6 (7) en ordonnée (axe y, échelle logarithmique) en fonction des valeurs respectives des concentrations anti-GAD<sub>65</sub> en abscisse (axe x, échelle logarithmique).

Les concentrations anti-GAD<sub>65</sub> des contrôles et des échantillons inconnus sont déterminées directement en U/ml à partir de leur valeur respective en cpm.

Les valeurs correspondantes des pourcentages de liaison B en relation avec l'activité totale B/T (%) peuvent être également utilisées pour construire la courbe d'étalonnage.

CentAK anti-GAD<sub>65</sub> peut être interprété à l'aide d'un logiciel adapté utilisant un mode de lissage spline compatible avec les dosages immunoradiométriques (IRMA).

## Exemple de courbe d'étalonnage

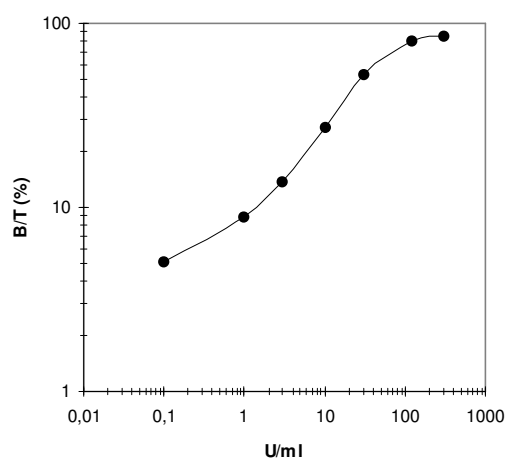
(approximativement 4 semaines avant la date d'expiration)

**A ne pas utiliser lors des tests !**



tubes	cpm (a)	cpm (b)	cpm moy.	B/T (%)	U/ml
Radioactivité totale <b>T</b>	29951	29878	29914	100	---
Standard <b>1</b>	1580	1483	1532	5,1	<b>0,1</b>
Standard <b>2</b>	2633	2692	2663	8,9	<b>1</b>
Standard <b>3</b>	4125	4144	4134	13,8	<b>3</b>
Standard <b>4</b>	8095	8989	8163	27,2	<b>10</b>
Standard <b>5</b>	15624	16122	15872	53,1	<b>30</b>
Standard <b>6</b>	24156	24054	24105	80,6	<b>120</b>
Standard <b>7</b>	25613	25217	25414	85	<b>300</b>
Contrôle I	---	---	---	---	---
Contrôle II	---	---	---	---	---
Patient 1	20117	20080	20099	67,2	<b>53</b>

## Exemple de courbe d'étalonnage



## VALEURS DE REFERENCE

CentAK anti-GAD <sub>65</sub>	
Anticorps anti-GAD <sub>65</sub> négatifs	< 0,9 U/ml
Anticorps anti-GAD <sub>65</sub> positifs	≥ 0,9 U/ml

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs normales et pathologiques. De ce fait, les valeurs ci-dessus sont données uniquement à titre indicatif. Les valeurs sont établies en comparant les données obtenues à partir de patients diabétiques de type 1 et de patients sains par une analyse ROC.

## DONNEES ANALYTIQUES

### Calibration

Les unités du CentAK anti- GAD<sub>65</sub> sont des unités arbitraires. CentAK anti- GAD<sub>65</sub> a passé le 3ème niveau d'aptitude GAD65Ab de l'Université de Louisiane, Nouvelle-Orléans, Etats-Unis, en 1999 avec 100% de spécificité et 100% de sensibilité.

### Parallélisme des standards et des échantillons sériques

Des tests de dilution peuvent être effectués en diluant des échantillons positifs dans du sérum ne contenant pas d'anticorps anti- GAD<sub>65</sub>. Toutefois, en raison de la nature hétérogène de la population d'anticorps dans le sérum humain et au vu de la spécificité et la sensibilité des épitopes des anticorps, les résultats obtenus peuvent ne pas correspondre aux valeurs théoriques attendues.

### Spécificité

La grande pureté du traceur (<sup>125</sup>I- GAD<sub>65</sub>) permet de garantir que seuls les anticorps anti-GAD<sub>65</sub> vont réagir et qu'aucune réaction croisée avec les anticorps anti-IA2, anti-thyroglobuline, anti-thyroperoxidase, anti-TSH récepteur ou anti-acétylcholine récepteur n'est possible.

### Sensibilité (limite de détection)

La définition la plus appropriée et statistiquement acceptable de la concentration minimale détectable de tout dosage est à présent la sensibilité fonctionnelle du dosage.

La sensibilité fonctionnelle représente généralement la concentration la plus faible pour laquelle la répétabilité (précision intra-essai) est de 10% et la reproductibilité (précision inter-essai) est de 20%. Dans des conditions correctes d'utilisation du CentAK anti- GAD<sub>65</sub>, la valeur de sensibilité se situe à 0,6 U/ml.

En conséquence, les valeurs d'anti- GAD<sub>65</sub> inférieures à ce seuil ne répondent pas aux critères statistiques de fiabilité définis par les bonnes pratiques de laboratoire, et ne peuvent pas être distinguées du zéro avec une précision statistique suffisante.

Les concentrations en anti- GAD<sub>65</sub> supérieures à 0,6 U/ml sont considérées comme tout à fait valides.

## Limites de la méthode

Les sujets sains doivent fournir un résultat négatif en utilisant le kit CentAK anti- GAD<sub>65</sub>.

Cependant, les anticorps anti- GAD<sub>65</sub> sont aussi présents dans 60% des cas de syndrome de l'homme raide. Chez ces patients, les taux d'anticorps sont beaucoup plus élevés que chez les diabétiques de type 1. C'est pourquoi, en cas de suspicion de SHR, il est conseillé de diluer 1/50 et 1/100 les échantillons avec du sérum humain négatif en anti-GAD<sub>65</sub>. Dans le SHR, on retrouve également des anti-GAD<sub>65</sub> dans le liquide céphalo-rachidien.

Aucun diagnostic ne doit être basé uniquement sur les résultats d'une méthode de diagnostic *in vitro*.

## CentAK anti- GAD<sub>65</sub>




### PROTOCOLE RESUME

1	Numéroter les tubes*	CAL 1 – 6 (7)	CI - CII	Patient 1, 2 etc.	T
2	Distribuer Standards 1 – 6 (7)	20 µl	20 µl	20 µl	
	Contrôles I - II				
	Echantillons				
3	Distribuer Traceur (préparé à partir de D et J)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
4	Incuber**	2 heures à température ambiante			
5	Distribuer Suspension protéine A (préparée à partir de J et L)	50 µl	50 µl	50 µl	
6	Incuber**	60 minutes (à température ambiante)			
7	Distribuer BUFD (J)	1 ml	1 ml	1 ml	
8	Centrifuger	20 minutes à 1500 x g			
9	Décantier ou aspirer le surnageant	Laisser les tubes retournés sur du papier absorbant (pendant 5 - 10 minutes)			
10	Comptage de la radioactivité	Temps de comptage : 1 minute			

\* utiliser des tubes coniques

\*\* avant l'incubation, agiter brièvement les tubes afin d'assurer l'homogénéité des conditions de réaction.

## PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Ce coffret est destiné uniquement à un usage *in vitro*. Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
- Respecter les dates d'expiration sur les étiquettes.
- Ne pas utiliser ou mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser des réactifs d'autres fabricants.
- Eviter les temps morts durant la distribution des réactifs.
- Tous les réactifs doivent être stockés à 2 – 8 °C dans l'emballage d'origine avant toute utilisation.
-  • Certains des réactifs contiennent de faible quantité d'azoture de sodium (< 0,1%). Ils ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses.
-  • Les produits d'origine humaine ont subi un dépistage négatif vis-à-vis des anticorps anti-VIH, anti-VHC et de l'antigène HBS. Toutefois, aucun test de laboratoire ne peut garantir l'absence de ces agents viraux. Les réactifs comme les échantillons doivent donc être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.
-  • Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives, en respectant les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants :
  - Ne pas fumer, manger ou boire lors de la manipulation de produits radioactifs.
  - Toujours utiliser des gants de protection.
  - Ne jamais pipeter les solutions radioactives avec la bouche.
  - Chaque contamination ou perte de substance radioactive se fera en accord avec les réglementations en vigueur.
  - Nettoyer rapidement les substances radioactives renversées et bien laver la surface contaminée avec un décontaminant.