








Anti-GAD MODE D'EMPLOI

96 déterminations

REF 3802



Test immunoenzymatique (ELISA) pour le dosage des auto-anticorps anti-GAD₆₅ (glutamate décarboxylase) dans le sérum humain.

REF	N° de catalogue	LOT	N° de lot
	Se référer aux documents		Fabriqué par
	A stocker à		Date de péremption
	Consulter le mode d'emploi	D	Risque biologique

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 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 ELISA 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 (GAD₆₅).

La GAD, l'enzyme qui catalyse la conversion du glutamate en GABA, existe sous deux

isoformes de poids moléculaires 65000 (GAD₆₅) et 67000 (GAD₆₇). Les anticorps anti-GAD₆₅ 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- GAD₆₅ 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- GAD₆₅ sont majoritairement dirigés contre les épitopes conformationnels. **Les anticorps anti- GAD₆₅ 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-GAD₆₅ et anti-GAD₆₅ 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-GAD₆₅ et anti- GAD₆₅ 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-GAD₆₅ 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 hypoglycémiantes 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- GAD₆₅ dans le sérum de ces patients constitue un marqueur sensible et spécifique d'une évolution vers l'insulino-dépendance.

Batstra M, Anstoot H, Herbrink P: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using β -cell autoantibodies. Clin Lab 2001; 47:497-507 - Seissler J., Hatziagelaki E, Scherbaum WA: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001; 109 Suppl 2: S304-S316

- Pozzilli P, Manfrini S, Monetini L: Biochemical markers of type 1 diabetes; clinical use. Scand J Clin Lab Invest 2001;61:38-44

- Scherthaner G, Hink S, Kopp HP et al.: Progress in the characterization of slowly progressive autoimmune diabetes in adult patients (LADA or type 1,5 diabetes). Exp Clin Endocrinol diabetes 2001; Suppl 2: S94-S108

- Winter WE, Harris N; Schatz D: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. Clinical Diabetes 2002; 20: 183-191

PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse Medizym® anti-GAD est un dosage immuno-enzymatique quantitatif pour la détermination des IgG contre la glutamate décarboxylase dans le sérum humain.

Le dosage exploite la capacité des anticorps anti- GAD₆₅ de former un pont entre de la GAD₆₅ biotinylée en solution et de la GAD₆₅ fixée sur le polystyrène des microcupules.

Dans une première étape, les anti- GAD₆₅ présents dans l'échantillon se lient à la GAD₆₅ de la phase solide. Dans une deuxième étape, la GAD₆₅ biotinylée se lie à ce complexe. Après 60

minutes d'incubation, l'excès de GAD₆₅ biotinylée est éliminé par lavage. La quantité de GAD₆₅ biotinylée restante est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps dans l'échantillon.

La troisième étape consiste à ajouter une solution de streptavidine-peroxydase de raifort qui se lie à la biotine précédemment retenue sur la phase solide.

Au terme d'une troisième incubation de 20 minutes à température ambiante, l'excès de streptavidine-peroxydase est éliminé par lavage, puis la présence de l'enzyme est révélée par un substrat chromogène (TMB). La densité optique de l'échantillon est déterminée par lecture à 450 nm sur un lecteur de microplaques après addition d'une solution d'arrêt : la valeur obtenue est comparée à la densité optique fournie par des calibrateurs de concentrations connues en anticorps anti-GAD.

ECHANTILLONS DES PATIENTS

Prélèvement et conservation des échantillons

Le sang est prélevé par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum est récupéré par centrifugation. Ne pas utiliser du plasma.

Les échantillons hémolysés ou lipidiques ne peuvent pas être utilisés avec cette trousse de dosage.

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

Préparation avant utilisation

Laisser les échantillons atteindre la température ambiante. Prendre soin d'agiter les échantillons de sérum pour obtenir une certaine homogénéité.

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.

Composition du kit pour 96 déterminations

A	Microplaque , 12 barrettes sécables de 8 cupules revêtues avec de la GAD ₆₅ recombinante humaine	1 plaque scellée sous vide avec dessicant Prête à l'emploi
	MP	
B	Tampon de lavage Concentré pour l'obtention de 1250 ml de solution de lavage.	1 flacon, 125 ml
	WASHB	
D	Streptavidine-peroxydase (SA-POD) Concentré pour l'obtention de 14 ml	0,7 ml Concentré
	CONJ	
E	Substrat 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine dans du tampon citrate contenant du peroxyde d'hydrogène	15 ml Prêt à l'emploi
	SUB	
F	Solution d'arrêt 0,25 M d'acide sulfurique	15 ml Prêt à l'emploi
	STOP	
G	Diluant pour SA-POD (D)	15 ml Prêt à l'emploi
	BUF D	
H	GAD₆₅ biotinylée	3 flacons Lyophilisés
	START	
J	Diluant pour la GAD₆₅ biotinylée	2 x 15 ml Prêts à l'emploi Colorés en rouge
	BUF H	
CI	Contrôle négatif	0,7 ml Prêt à l'emploi
	CONTROL	L
CII	Contrôle positif (la concentration est spécifiée sur le certificat d'analyse)	0,7 ml Prêt à l'emploi
	CONTROL	L
I-5	Calibrateurs (les concentrations sont spécifiées sur le certificat d'analyse)	5 x 0,7 ml Prêts à l'emploi
	CAL	L

Matériel non fourni

- micropipette 10 - 100 µl
- pipette multicanaux et réservoir
- peigne de lavage à 8 canaux avec pompe à vide ou laveur de microplaques
- agitateur rotatif capable d'au moins 500 rpm
- lecteur de microplaque avec filtres optiques 450 nm, 620 nm ou 690 nm
- eau distillée ou déionisée

Format et conservation

La trousse anti-GAD a été conçue pour 96 déterminations, soit 40 échantillons de patients dosés 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 de la trousse doivent être conservés à 2 – 8 °C, de préférence dans l'emballage d'origine.

Après ouverture du coffret, tous les composants sont stables pour un minimum de 2 mois s'ils sont stockés correctement.

Préparation avant l'emploi

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

A- La plaque de microtitration est scellée sous vide avec un dessicant. La plaque est composée d'un cadre et de barrettes de cupules sécables. Porter la plaque à température ambiante avant d'ouvrir son emballage. Les cupules inutilisées doivent être conservées à 2-8°C et replacées dans l'emballage d'origine pour les protéger de l'humidité.

B- Préparer une quantité suffisante de solution de lavage en diluant le tampon concentré 10x (1+9) avec de l'eau déionisée ou de l'eau distillée. La solution de lavage diluée est stable à 2-8°C pendant 30 jours. Veiller à ce que le concentré soit exempt de cristaux avant de procéder à la dilution. Si des cristaux sont présents, les dissoudre en chauffant à une température maximale de 37°C.

D- Préparer une quantité suffisante de streptavidine-peroxydase en diluant une partie du concentré D dans 19 parties de diluant G. Exemple : 0,25 ml de SA-POD dans 4,75 ml de diluant pour SA-POD. La solution diluée est stable 16 semaines à 2-8°C.

E- Eviter d'exposer le substrat à la lumière.

H- Préparer une quantité suffisante de GAD biotinylée en reconstituant un flacon lyophilisé H avec 5,5 ml de diluant pour GAD biotinylée (J) juste avant emploi. Les solutions de GAD biotinylée peuvent se conserver 3 jours à 2 - 8°C.

PROTOCOLE DE DOSAGE

Il est recommandé de travailler en double

1. Pipeter
 - 25 µl de contrôle négatif CI et de calibrateurs (1-5)
 - 25 µl de contrôle positif CII et des échantillons sériques des patients
2. Couvrir la plaque et incuber 60 minutes à température du laboratoire (18-25°C) sous agitation à plus de 500 rpm.
3. Aspirer ou vider les cupules par inversion suivie d'un séchage obtenu par en tapotant la plaque sur du papier absorbant. Laver chaque cupule **3 fois** avec 300 µl de solution de lavage (préparée à partir de **B**). Temps de contact de la solution de lavage : 5 secondes.
4. Ajouter 100 µl de GAD biotinylée (préparée à partir de **H et de J**) à chaque cupule.
5. Couvrir la plaque et incuber 60 minutes à température du laboratoire (18-25°C) sous agitation à plus de 500 rpm.
6. Aspirer ou vider les cupules par inversion suivie d'un séchage obtenu par en tapotant la plaque sur du papier absorbant. Laver chaque cupule **3 fois** avec 300 µl de solution de lavage (préparée à partir de **B**). Temps de contact de la solution de lavage : 5 secondes.
7. Ajouter 100 µl de la solution de streptavidine peroxydase (préparée à partir de **D et de G**) à chaque cupule.
8. Couvrir la plaque et incuber 20 minutes à température du laboratoire (18-25°C) sous agitation à plus de 500 rpm.
9. Aspirer ou vider les cupules par inversion suivie d'un séchage obtenu par en tapotant la plaque sur du papier absorbant. Laver chaque cupule **3 fois** avec 300 µl de solution de lavage (préparée à partir de **B**). Temps de contact de la solution de lavage : 5 secondes.
10. Ajouter 100 µl de substrat (**E**) à chaque cupule et mélanger doucement.
11. Incuber à l'abri de la lumière pendant 20 minutes.
12. Ajouter la solution d'arrêt (**F**) après exactement 20 minutes à chaque cupule.
13. Agiter la plaque pendant 5 secondes à plus de 200 rpm.

14. Lire les densités optiques à 450 nm dans les **5 minutes** suivant l'étape 13.

Remarques : les étapes de lavage sont essentielles pour garantir de bons résultats. Les lavages insuffisants entraînent une mauvaise précision et des DO faussement élevées. Sans agitation, les DO obtenues seront réduites de 20% entraînant une perte de sensibilité.

CALCUL DES RÉSULTATS

Calculer la moyenne des DO pour chaque paire de cupules (calibrateurs, contrôles et échantillons).

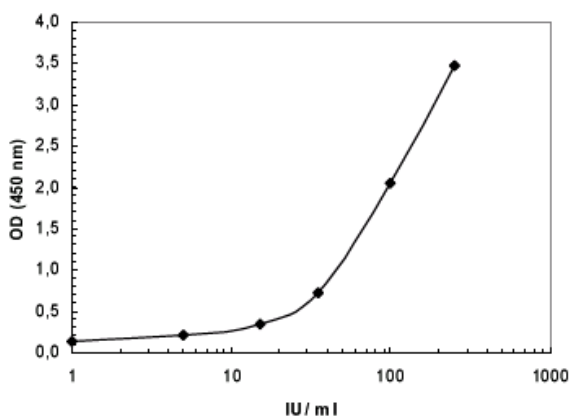
Construire sur du papier semi-logarithmique une courbe d'étalonnage en portant en ordonnée les DO des calibrateurs et leurs concentrations en abscisse.

En fonction de la DO de chaque échantillon, lire directement la concentration **sans appliquer de facteur de dilution**.

Exemples de courbe d'étalonnage

A ne pas utiliser lors des tests !

IgG	DO1	DO2	DO Moyenne	UI/ml
Contrôle CI	0,145	0,121	0,133	1
Calibrateur 1	0,244	0,283	0,264	5
Calibrateur 2	0,351	0,391	0,371	15
Calibrateur 3	0,684	0,740	0,712	35
Calibrateur 4	1,765	1,868	1,817	100
Calibrateur 5	3,397	3,702	3,550	250
Contrôle CII	1,502	1,478	1,490	76
Patient 1	0,850	0,857	0,854	41,8



VALEURS DE REFERENCE

Anti-GAD	UI/ml
Positif	$\geq 5,0$
Négatif	$< 5,0$

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.

Limites du test

Les patients sains doivent être négatifs en utilisant le coffret anti-GAD. Toutefois, on peut observer un résultat positif chez certaines personnes apparemment saines.

Tout diagnostic ne doit pas être basé sur le seul résultat de la biologie, le médecin devant prendre en compte l'ensemble des aspects cliniques et biologiques.

DONNEES ANALYTIQUES

Calibration

La trousse Medizym anti-GAD est calibrée contre la préparation de référence de l'OMS NIBSC 97/550 et par conséquent les concentrations en anti-GAD sont exprimées en UI/ml.

Linéarité

Des tests de dilution peuvent être effectués en diluant des échantillons positifs dans du sérum ne contenant pas d'anticorps anti-GAD₆₅. 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 et sensibilité

En utilisant un seuil de 5 UI/ml, la trousse Medizym anti-GAD possède une sensibilité de 92,3% et une spécificité clinique de 98,6% par rapport au diabète de type I nouvellement diagnostiqué.

Limites de détection

La sensibilité analytique (limite de détection basse, 0 +/- 3SD) est de 0,8 UI/ml.

La sensibilité fonctionnelle pour un coefficient de variation (reproductibilité) de 20% est de 4 UI/ml.

Précision

Répétabilité

Echantillon n°	Concentration moyenne (UI/ml)	CV (%)
1	16	4
2	60	4
3	151	4
4	256	3

Reproductibilité

Echantillon n°	Concentration moyenne (UI/ml)	CV (%)
5	5	14
6	42	7
7	99	3
8	237	25

LIMITES DE LA MÉTHODE

Les sujets sains doivent fournir un résultat négatif en utilisant le kit CentAK anti- GAD₆₅.

Cependant, les anticorps anti- GAD₆₅ 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-GAD₆₅. Dans le SHR, on retrouve également des anti-GAD₆₅ dans le liquide céphalo-rachidien.



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

PROTOCOLE RESUME

Amener tous les réactifs à température ambiante et les mélanger soigneusement pour assurer une homogénéité.

Etapes		CI / CAL	CII	Patient 1,2 etc.
1	Pipeter échantillons	25 µl	25 µl	25 µl
2	Incuber	60 minutes à température ambiante avec agitation (>500 rpm)		
3	Laver et décanter	3 x 300 µl (à partir de B)		
4	Pipeter la solution de GAD biotinylée	100 µl	100 µl	100 µl
5	Incuber	60 minutes à température ambiante avec agitation (>500 rpm)		
6	Laver et décanter	3 x 300 µl (à partir de B)		
7	Pipeter la solution SA-POD	100 µl	100 µl	100 µl
8	Incuber	20 minutes à température ambiante avec agitation (>500 rpm)		
9	Laver et décanter	3 x 300 µl (à partir de B)		
10	Pipeter le substrat	100 µl	100 µl	100 µl
11	Incuber	20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière		
12	Pipeter et mélanger la solution d'arrêt	100 µl	100 µl	100 µl
13	Mesurer la DO à 450 nm dans les 5 minutes			

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Ce coffret est destiné uniquement à un usage *in vitro*. Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
- Les dates d'expiration sur les différentes étiquettes doivent être respectées, ainsi que les délais de conservation des réactifs après reconstitution.
- 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.
- Eviter tout contact de l'acide sulfurique (solution d'arrêt) avec la peau et les muqueuses. En cas d'éclaboussures, laver immédiatement à l'eau.
-  • Certains des réactifs contiennent de faibles quantités de thimérosal (< 0,1%) et de kathon (1% v/v). 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.

Distribution en France :

LABODIA

LABODIA France
266 avenue Daumesnil
75012 PARIS

 N° Vert 0800 114 700

Fax : 03.21.49.59.56

E-mail : info@labodia.com

Website : www.labodia.com