



Istruzioni per l'uso

Valido a partire da 07.03.2023

CentAK® anti-GAD₆₅ M

REF	2070	Σ	100
REF	2071	Σ	50

Saggio radioimmunologico per la determinazione degli anticorpi contro la decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD₆₅) nel siero umano



Medipan GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow OT Dahlewitz
Germania

Telefono: +49 33708 4417 0
Fax: +49 33708 4417 25

info@medipan.de
www.medipan.de



1 Destinazione d'uso

Il CentAK® anti-GAD₆₅ M è un immunodosaggio quantitativo per la determinazione degli anticorpi contro la decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD₆₅) nel siero umano.

Il CentAK® anti-GAD₆₅ M è inteso come ausilio nella diagnosi del diabete mellito autoimmune di tipo 1 in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

L'immunodosaggio è progettato per l'uso professionale manuale nella diagnostica *in vitro*.

2 Rilevanza diagnostica

Il diabete mellito di tipo 1 è una malattia autoimmune cronica in cui le cellule beta produttrici di insulina delle isole di Langerhans nel pancreas vengono distrutte. La conseguenza di questa distruzione è una ridotta produzione di insulina, che si traduce in alti livelli di zucchero nel sangue come il diabete mellito. Le predisposizioni genetiche e le infezioni virali sono considerate fattori di rischio, ma le cause esatte non sono state ancora del tutto chiarite.

La distruzione delle cellule beta produttrici di insulina del pancreas si basa sulla presenza di anticorpi contro le cellule insulari (ICA), che sono diretti contro diversi antigeni delle cellule delle isole pancreatiche, come l'acido glutammico decarbossilasi (GAD65), la tirosina fosfatasi (insulinoma -associato all'antigene 2, IA2), il trasportatore di zinco 8 (ZnT8) e contro l'insulina. Gli anticorpi delle cellule insulari (ICA) possono essere rilevati nel 70-80% dei pazienti con diabete mellito. I diversi anticorpi di solito compaiono mesi o anni prima del verificarsi di livelli elevati di zucchero nel sangue e sono quindi considerati anche importanti marcatori prognostici per identificare i pazienti con un aumentato rischio di sviluppare diabete mellito di tipo 1. Il

rilevamento combinato di anticorpi contro GAD65, IA2, ZnT8 e l'insulina è considerata un metodo importante per la diagnosi del diabete mellito di tipo 1 all'inizio della malattia.

La decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD) catalizza la sintesi del neurotrasmettitore GABA nel cervello e nelle cellule beta. Sono note due isoforme dell'enzima: GAD65 con un peso molecolare di 65 kDa e GAD67 con 67 kDa. Gli anticorpi diretti contro GAD65 sono rilevati nella maggior parte dei pazienti con diabete mellito di tipo 1 e in un gran numero di pazienti nella fase prediabetica. Al contrario, i pazienti con la rarissima sindrome dell'uomo rigido neuromuscolare hanno anticorpi contro entrambe le isoforme GAD.

3 Principio del saggio

I saggi radioimmunologici sono ampiamente utilizzati per la determinazione di anticorpi specifici. A questo scopo, molecole traccianti composte da antigeni coniugati a componenti radioattivi rilevano anticorpi specifici nel campione del paziente. La proteina A lega gli anticorpi del campione e consente la semplice separazione degli immunocomplessi agglutinati dalla miscela di reazione mediante centrifugazione. La radioattività del precipitato è misurata e risulta proporzionale all'attività degli anticorpi nel campione.

4 Componenti del saggio

Componente	Descrizione
100 (50) Determinazioni	
Calibratore 1 - 6 CAL 6 x 0,25 mL	Diluizioni di siero umano (pronte all'uso; contengono azoturo di sodio) Le attività anticorpali sono indicate nel certificato di controllo della qualità.
Controllo basso CI CONTROL 1 x 0,25 mL	Diluizione di siero umano (pronto all'uso; contiene azoturo di sodio) L'attività dell'anticorpo è indicata sul certificato di controllo di qualità.
Controllo alto CII CONTROL 1 x 0,25 mL	Diluizione di siero umano (pronto all'uso; contiene azoturo di sodio) L'attività dell'anticorpo è indicata sul certificato di controllo di qualità.
Tracciante D TRAC 2 (1) liofilizzato/i	 GAD ricombinante umano ₆₅ coniugato a Iodio-125 (< 0,05 MBq, t _{1/2} = 59 giorni; radiazione gamma 35 keV, radiazione x 27 keV, 31 keV; (liofilizzato, contiene azoturo di sodio)
Tampone di ricostituzione H RBU 1 x 12 (6) mL	Soluzione (pronta all'uso; contiene azoturo di sodio)
Tampone di precipitazione J PBU 1 x 110 (55) mL	Soluzione (pronta all'uso; contiene azoturo di sodio)
Proteina A L PA 2 (1) liofilizzato/i	Sospensione di proteina A (liofilizzata, contiene azoturo di sodio)
Certificato CQ 1 pezzo	-
Istruzioni per l'uso 1 pezzo	-

5 Materiale necessario ma non fornito

- Attrezzature di laboratorio comuni
- Pipette di precisione (5-1000 µL) e puntali monouso
- Cilindri graduati (100 - 1000 mL)
- Provette coniche per campioni e portaprovette
- Miscelatore a vortice o altri rotatori
- Centrifuga
- Contatore γ
- Carta assorbente
- Acqua distillata o deionizzata

6 Conservazione e stabilità

Una volta ricevuti, tutti i componenti del saggio devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C, preferibilmente nella confezione originale del kit. Se conservati correttamente nei loro contenitori originali, tutti i componenti sono stabili fino alla data di scadenza.

7 Informazioni generali

Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro*. Le istruzioni per l'uso devono essere lette attentamente prima dell'uso. Esse sono valide solo per il presente prodotto con la composizione indicata e devono essere seguite rigorosamente per garantirne risultati affidabili. Eventuali deviazioni possono portare a risultati errati. I componenti non devono essere scambiati con reagenti di lotti diversi o di altri produttori.

La contaminazione dei reagenti deve essere evitata utilizzando tecniche asettiche durante il prelievo dai contenitori. Dopo l'uso, le fiale di reagente devono essere chiuse ermeticamente con i rispettivi tappi.

La contaminazione incrociata di campioni o reagenti può portare a risultati incoerenti e deve essere evitata utilizzando tecniche di pipettaggio coerenti.

8 Preparazione

8.1 Preparazione dei reagenti

Tutti i componenti devono essere portati a temperatura ambiente (TA: da 18 °C a 25 °C) prima dell'uso per almeno 30 minuti; ad eccezione del tampone di precipitazione che deve essere conservato a 2 °C-8 °C fino all'uso. Tutti i componenti liquidi devono essere miscelati delicatamente per garantirne l'omogeneità.

8.1.1 Calibratori

I calibratori sono pronti all'uso e non devono essere ulteriormente diluiti. I calibratori devono essere utilizzati per ogni saggio.

8.1.2 Controlli

I controlli sono pronti all'uso e non devono essere ulteriormente diluiti. I controlli devono essere utilizzati in ogni analisi. I laboratori possono anche convalidare i propri campioni di controllo e utilizzarli in alternativa.

8.1.3 Tampone di ricostituzione

Il tampone di ricostituzione è pronto per l'uso e serve per la ricostituzione del tracciante e della proteina A.

8.1.4 Tracciante

Il tracciante è liofilizzato e deve essere ricostituito con 2,6 ml di tampone di ricostituzione per fiala. Il tracciante ricostituito rimane stabile per 2 settimane se conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

8.1.5 Proteina A

La proteina A è liofilizzata e deve essere ricostituita con 2,6 ml di tampone di ricostituzione per fiala. La soluzione ricostituita di proteina A rimane stabile per 2 settimane se conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

8.1.6 Tampone di precipitazione

Il tampone di precipitazione è pronto all'uso e deve essere conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino al momento dell'uso.

8.2 Preparazione dei campioni

8.2.1 Materiale campione

Si raccomanda l'uso di siero appena raccolto da sangue prelevato mediante venipuntura. Si deve evitare l'uso di campioni itterici, lipemici, emolitici o contaminati da batteri. Le sostanze insolubili devono essere rimosse dal campione mediante centrifugazione. I campioni non devono essere inattivati termicamente.

8.2.2 Conservazione dei campioni

I campioni possono essere conservati a 2 °C - 8 °C fino a tre giorni. La conservazione a lungo termine richiede -20 °C. È necessario evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti. Per un uso multiplo, i campioni devono essere aliquotati e conservati a -20 °C.

9 Prestazioni del saggio

9.1 Procedura

Per l'elaborazione del radiodosaggio si consigliano provette coniche. È necessario preparare una quantità sufficiente di provette per calibratori, controlli e campioni, compresa una provetta in più per analizzare il tracciante isolato come riferimento. È necessario rispettare i tempi e le temperature di incubazione indicati ed evitare significativi sbalzi di tempo durante il pipettaggio dei campioni e dei reagenti.

Fase	Descrizione
1. Aggiunta di calibratori, controlli e campioni non diluiti	Aggiungere 20 µL di calibratori, controlli e campioni non diluiti pronti all'uso per ogni provetta. Preparare un'ulteriore provetta per il materiale tracciante isolato per determinare la radioattività totale T come riferimento.
2. Aggiunta di tracciante	Aggiungere 50 µL di materiale tracciante preparato da D e H per ogni provetta, compresa la provetta aggiuntiva per determinare la radioattività totale T come riferimento. La provetta di riferimento per la radioattività totale T deve essere messa da parte fino al momento dell'analisi.
3. Incubazione	Incubare le provette per 2 ore a temperatura ambiente.
4. Aggiunta di proteina A	Aggiungere 50 µL di soluzione di proteina A preparata da L e H a ciascuna provetta.
5. Incubazione	Incubare le provette per 1 ora a temperatura ambiente.
6. Aggiunta del tampone di precipitazione	Aggiungere 1 mL di tampone di precipitazione freddo a ciascuna provetta e agitare con il vortex.
7. Centrifugazione	Centrifugare le provette per 30 min a 2 °C e 8 °C con 2000 x g.
8. Decantazione	Decantare o aspirare il surnatante. Per rimuovere il liquido residuo, capovolgere le provette (30 min) e assorbire le gocce tamponando su carta assorbente.
9. Analisi	Misurare la radioattività di tutte le provette, compresa la T, con un

contatore e un tempo di conteggio consigliato di 1 minuto.

10 Valutazione del saggio

10.1 Tracciabilità metrologica

L'immunodosaggio viene calibrato utilizzando un campione di riferimento interno. I risultati quantitativi sono espressi in U/mL.

10.2 Valutazione quantitativa

Per la generazione di una curva di calibrazione, la radioattività misurata (conteggi al minuto; cpm) dei calibratori viene tracciata rispetto alle loro attività anticorpali e correlata mediante interpolazione *spline*. Le attività anticorpali dei campioni sconosciuti possono essere derivate direttamente dalla loro radioattività misurata (conteggi al minuto; cpm) utilizzando la curva di calibrazione generata.

In alternativa, la valutazione quantitativa può basarsi sul calcolo iniziale dei tassi di legame B/T (%) dividendo la radioattività misurata (conteggi al minuto; cpm) di tutti i calibratori, i controlli e i campioni dei pazienti con la radioattività totale T. Per la generazione di una curva di calibrazione, i tassi di legame calcolati B/T (%) dei calibratori sono tracciati rispetto alle loro attività anticorpali e correlati mediante interpolazione *spline*. Le attività anticorpali dei campioni sconosciuti possono essere derivate direttamente dai tassi di legame calcolati B/T (%) utilizzando la curva di calibrazione generata.

10.3 Criteri di validità

I saggi sono validi solo se sono soddisfatti i seguenti criteri di validità:

- cpm o B/T (%) CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4 < CAL 5 < CAL 6
- I controlli devono presentare un'attività anticorpale compresa nell'intervallo di validità indicato nel certificato di controllo di qualità.

Se questi criteri non sono soddisfatti, il saggio non è valido e deve essere ripetuto.

10.4 Risoluzione dei problemi

In caso di saggi non validi, occorre verificare le date di scadenza e le condizioni di conservazione, i tempi e le temperature di incubazione e l'esatta calibrazione di tutti gli strumenti utilizzati. Se non è stato possibile identificare un motivo per cui il saggio non è valido, si prega di contattare il fornitore o il produttore del prodotto.

10.5 Intervalli di riferimento

Gli intervalli di riferimento sono indicati di seguito:

	Interpretazione
Attività anticorpale < 1 U/mL	negativo
Attività anticorpale 1 - 2 U/mL	incerto
Attività anticorpale > 2 U/mL	positivo

A causa delle diverse sieroprevalenze nelle singole regioni, ogni laboratorio deve verificare gli intervalli di riferimento con analisi proprie e adattarli, se necessario.

10.6 Interpretazione dei risultati dei saggi

Un risultato positivo del saggio indica la presenza di anticorpi specifici. Un risultato negativo indica l'assenza di anticorpi specifici, ma non esclude la possibilità di una reazione autoimmune. In caso di risultati incerto, non è possibile effettuare una valutazione affidabile.

10.7 Limiti del metodo

Gli autoanticorpi GAD₆₅ possono essere presenti anche nel siero o nel liquido cerebrospinale di pazienti affetti da una rara malattia neurologica, la sindrome della persona rigida (SPR). Gli autoanticorpi anti-GAD dei pazienti con SPR sono diretti principalmente verso epitopi lineari del GAD₆₅ e del GAD₆₇,

mentre gli anticorpi del diabete mellito di tipo 1 riconoscono solo epitopi conformazionali del GAD₆₅.

L'interpretazione dei risultati dei saggi deve sempre essere considerata in combinazione con il quadro clinico del paziente. La diagnosi non deve basarsi sui risultati di un solo metodo diagnostico. Tutti i risultati clinici e di laboratorio devono essere valutati per formulare una diagnosi. Per la conferma, è necessario eseguire ulteriori indagini.

11 Caratteristiche delle prestazioni

11.1 Caratteristiche delle prestazioni analitiche

11.1.1 Sensibilità e specificità analitica

Il limite di quantificazione (LoQ) è stato correlato a un coefficiente di variazione intra-saggio del 10 % e a un coefficiente di variazione inter-saggio del 20 %.

	Sensibilità analitica
Limite di quantificazione (LoQ)	0,7 U/mL

L'alta qualità del tracciante garantisce la reazione esclusiva degli autoanticorpi anti-GAD₆₅ nel principio del dosaggio diretto. Non esiste alcuna reazione crociata rilevabile con autoanticorpi contro la tireoglobulina, la perossidasi tiroidea, il recettore del TSH, l'IAA e l'IA₂.

11.1.2 Precisione

La precisione dei risultati del saggio è stata valutata mediante la determinazione della variazione intra- e inter-saggio attraverso l'analisi di più campioni con diverse attività anticorpali.

	Precisione intrasaggio		Precisione intersaggio	
	U/mL	CV (%)	U/mL	CV (%)
Campione 1	0,8	10,0	0,6	20,7
Campione 2	8,2	6,8	8,4	5,2
Campione 3	45,9	1,3	45,6	1,1

11.1.3 Intervallo di misura

L'accuratezza, l'esattezza, la precisione, la linearità e il recupero dei risultati del saggio sono stati osservati nell'intervallo di misura del saggio dal LoQ al calibratore superiore in studi completi. I campioni con risultati del saggio superiori al calibratore superiore devono essere riportati come >max. I campioni con risultati del saggio inferiori al LoQ devono essere indicati come <min. Se si osservano risultati del saggio superiori al calibratore superiore, i campioni possono essere analizzati a una diluizione superiore. L'attività anticorpale risultante deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione aggiuntivo.

11.2 Caratteristiche delle prestazioni diagnostiche

11.2.1 Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità sono state valutate attraverso l'analisi di 65 campioni di pazienti con diabete di tipo 1 e 392 campioni di donatori di sangue non selezionati.

	Prestazioni diagnostiche
Sensibilità	86,2 %
Specificità	96,7 %

12 Avvertenze e precauzioni

Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro* da parte di personale qualificato, autorizzato e addestrato. Tutti i componenti del saggio e i campioni umani devono essere maneggiati con cura in quanto potenzialmente pericolosi. È necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio (BPL) e a tutte le normative pertinenti.

Nel caso in cui il prodotto sia danneggiato o le informazioni sul prodotto, compresa l'etichettatura, siano errate o non corrette, si prega di contattare il produttore o il fornitore.

Questo prodotto contiene preparati di origine umana e/o animale. Qualsiasi materiale derivato da fluidi corporei umani o da organi utilizzati per la preparazione dei componenti è stato testato ed è risultato negativo all'HBsAg (Antigene di superficie del virus dell'epatite B) e agli anticorpi anti-HIV e anti-HCV. Tuttavia, tutti i componenti e tutti i campioni dei pazienti devono essere trattati come potenzialmente pericolosi in conformità alle leggi nazionali e alle linee guida appropriate sulla sicurezza biologica.

Poiché il prodotto contiene materiali potenzialmente pericolosi e/o radioattivi, è necessario seguire le seguenti precauzioni: Non fumare, mangiare o bere durante la manipolazione del materiale del kit o dei campioni. Evitare il contatto diretto con il materiale del kit o con i campioni indossando guanti protettivi, camice da laboratorio e occhiali di sicurezza. Non pipettare mai il materiale per bocca. Pulire prontamente le fuoriuscite e lavare accuratamente la superficie interessata con un decontaminante. Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.

Alcuni reagenti contengono azoturo di sodio (< 0,1%) come conservante e non devono essere ingeriti o lasciati entrare in contatto con la pelle o le mucose. La possibile formazione di azoturi di metalli pesanti negli scarichi deve essere evitata mediante un sufficiente risciacquo con acqua.

È necessario osservare le informazioni contenute nella scheda di sicurezza relative ai possibili pericoli, alle misure di primo soccorso, alle misure da adottare in caso di rilascio involontario di grandi quantità, alla manipolazione e allo stoccaggio, ai dispositivi di protezione individuale, alle informazioni sullo smaltimento e alle informazioni sulla tossicologia.

Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utilizzatore e/o il paziente.

13 Smaltimento

Per la decontaminazione e lo smaltimento è necessario attenersi alle raccomandazioni del CDC e alle linee guida e normative ambientali locali e nazionali pertinenti. I campioni, i materiali potenzialmente contaminati e i rifiuti infettivi devono essere decontaminati, ad esempio mediante autoclavaggio per 20 minuti a 121 °C.

Alcuni reagenti contengono materiale radioattivo. I tessuti, le provette, le coperture dei banchi, i guanti ecc. contaminati devono essere smaltiti in un contenitore appositamente contrassegnato. Smaltire i rifiuti radioattivi liquidi e solidi solo come consentito dalle autorità e dalle normative federali, statali o locali. È responsabilità dell'utente di questo prodotto manipolare il materiale radioattivo in conformità alle norme nazionali previste dalla legge o ad altre dichiarazioni delle autorità locali.

14 Riferimenti

- Batstra MR, Anstoot HJ, Herbrink P: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using β -cell autoantibodies. Clin Lab 2001; 47: 497 – 507.
- Seissler J, Hatziaelaki E, Scherbaum WA: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001; 109: Suppl 2: 304 – 16.

- Pozzilli P, Manfrini S, Monetini L: Biochemical markers of type 1 diabetes, clinical use. Scand J Clin Lab Invest. Suppl 2001; 235: 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; 109: Suppl 2: 94 – 108.
- Winter WE, Harris N, Schatz D: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. Clinical Diabetes 2002; 20: 183 – 91.

15 Simboli

	Produttore
	Marchio di conformità CE
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	Numero di catalogo
	Identificatore univoco del dispositivo
	Codice lotto
	Limite di temperatura
	Data di scadenza
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Contiene un numero sufficiente per <n> saggi
	Non riutilizzare
	Attenzione
	Tenere lontano dalla luce del sole
	Materiale radioattivo o radiazioni ionizzanti
	Calibratore
	Controllo
	Tracciante
	Tampone di ricostituzione / Tampone
	Tampone di precipitazione
	Soluzione di proteina A

16 Modifiche

Modifiche alle attuali istruzioni per l'uso	
Versione attuale	014/03.2023
Sintesi delle modifiche	Modifiche redazionali nel capitolo 2