



Gebrauchsanweisung

Gültig ab 07.03.2023

CentAK® anti-GAD₆₅ M

REF	2070	Σ	100
REF	2071	Σ	50

Radioimmunoassay zur Bestimmung von Antikörpern gegen Glutamat Decarboxylase (GAD₆₅) in humanem Serum



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

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

info@medipan.de
www.medipan.de



1 Zweckbestimmung

Der CentAK® anti-GAD₆₅ M ist ein quantitativer Immunoassay zur Bestimmung von Antikörpern gegen Glutamat Decarboxylase (GAD₆₅) in humanem Serum.

Der CentAK® anti-GAD₆₅ M dient zur Unterstützung bei der Diagnose des autoimmunen Diabetes mellitus Typ 1 in Verbindung mit anderen klinischen und laboratoriumsmedizinischen Untersuchungen

Der Immunoassay ist für den manuellen professionellen in-vitro diagnostischen Gebrauch bestimmt.

2 Diagnostische Bedeutung

Diabetes mellitus Typ 1 ist eine chronische Autoimmunerkrankung, bei der die insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse zerstört werden. Die Folge dieser Zerstörung ist eine verminderte Insulinproduktion, die sich schließlich als Diabetes mellitus mit hohen Blutzuckerspiegeln manifestiert. Als Risikofaktoren gelten genetische Prädispositionen sowie Virusinfektionen, allerdings sind die genauen Ursachen noch nicht völlig geklärt.

Die Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen der Bauchspeicheldrüse basiert auf der Bildung von Inselzellantikörpern (ICA), die sich gegen unterschiedliche Antigene der pankreatischen Inselzellen richten, wie gegen die Glutaminsäuredecarboxylase (GAD₆₅), die Proteintyrosinphosphatase (Insulinoma-assoziiertes Antigen 2, IA2), den Zinktransporter 8 (ZnT8) sowie gegen Insulin. Inselzellantikörper (ICA) können bei 70 – 80 % der Patienten mit Diabetes mellitus nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Antikörper treten in der Regel bereits Monate bis Jahre vor dem Auftreten erhöhter Blutzuckerwerte auf und gelten somit auch als wichtige prognostische Marker, um Patienten mit erhöhtem Risiko zu identifizieren, einen Diabetes mellitus Typ 1 zu entwickeln. Der kombinierte Nachweis von Antikörpern gegen GAD₆₅, IA2, ZnT8 und Insulin gilt als wichtige Methode, einen Diabetes mellitus Typ 1 bereits bei Krankheitsbeginn zu diagnostizieren.

Glutaminsäuredecarboxylase (GAD) katalysiert die Synthese des Neurotransmitters GABA im Gehirn und in den Betazellen. Zwei Isoformen des Enzyms sind bekannt: GAD₆₅ mit einem Molekulargewicht von 65 kDa bzw. GAD₆₇ mit 67 kDa. Gegen GAD₆₅ gerichtete Antikörper werden bei der Mehrzahl der Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und bei einer großen Anzahl von Patienten bereits in der prädiabetischen Phase nachgewiesen. Im Gegensatz dazu treten bei Patienten mit dem sehr seltenen neuromuskulären Stiff-man-Syndrom Antikörper gegen beide GAD-Isoformen auf.

3 Testprinzip

Radioimmunoassays werden häufig zur Bestimmung spezifischer Antikörper verwendet. Zu diesem Zweck detektieren Tracermoleküle bestehend aus einem Antigen und einer radioaktiven Komponente spezifische Antikörper in der Patientenprobe. Protein A binden die Antikörper aus der Probe und ermöglichen die einfache Trennung der gebildeten Immunkomplexe von der Reaktionsmischung durch Zentrifugation. Die Radioaktivität des Präzipitats wird gemessen und ist proportional zur Antikörperaktivität in der Probe.

4 Testkomponenten

Komponente 100 (50) Bestimmungen	Beschreibung
Kalibrator 1 – 6 CAL 6 x 0,25 mL	Verdünnungen von humanem Serum (gebrauchsfertig; enthalten Natriumazid) Die Antikörperaktivitäten sind auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben.
Niedrige Kontrolle CI CONTROL 1 x 0,25 mL	Verdünnung von humanem Serum (gebrauchsfertig; enthält Natriumazid) Die Antikörperaktivität ist auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben.
Hohe Kontrolle CII CONTROL 1 x 0,25 mL	Verdünnung von humanem Serum (gebrauchsfertig; enthält Natriumazid) Die Antikörperaktivität ist auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben.
Tracer D TRAC  2 (1) Lyophilisat(e)	Humane rekombinante GAD ₆₅ konjugiert mit Iod-125 (< 0,05 MBq, t _{1/2} = 59 Tage; gamma Strahlung 35 keV, x Strahlung 27 keV, 31 keV; lyophilisiert; enthält Natriumazid)
Rekonstitutionspuffer H RBU 1 x 12 (6) mL	Lösung (gebrauchsfertig, enthält Natriumazid)
Präzipitationspuffer J PBU 1 x 110 (55) mL	Lösung (gebrauchsfertig, enthält Natriumazid)
Protein A L PA 2 (1) Lyophilisat(e)	Suspension mit Protein A (lyophilisiert; enthält Natriumazid)
Qualitätskontrollzertifikat 1 Stück	-
Gebrauchsanweisung 1 Stück	-

5 Zusätzlich benötigtes Material

- Übliche Laborausrüstung
- Präzisionspipetten (5 – 1000 µL) und Einwegpipettenspitzen

- Spitzbodenprobenröhrchen und Probenrack
- Vortex Mixer oder anderer Rotator
- Zentrifuge
- γ -Counter
- Adsorbierendes Papier oder Papiertücher
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

6 Lagerung und Haltbarkeit

Nach Erhalt müssen alle Testkomponenten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden, vorzugsweise in der Originalverpackung des Kits. Bei sachgemäßer Lagerung in den Originalbehältern sind alle Komponenten bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

7 Allgemeine Hinweise

Dieses Produkt ist nur für die *In-vitro*-Diagnostik bestimmt. Die Gebrauchsanweisung ist vor Anwendung sorgfältig zu lesen. Sie gilt nur für das vorliegende Produkt mit der angegebenen Zusammensetzung. Die Gebrauchsanweisung muss strikt befolgt werden, um zuverlässige Testergebnisse zu gewährleisten. Abweichungen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Komponenten dürfen nicht durch Testreagenzien anderer Chargen oder anderer Hersteller ausgetauscht werden.

Kontaminationen der Reagenzien müssen durch Anwendung aseptischer Techniken bei der Entnahme von Aliquots aus den Fläschchen vermieden werden. Nach Gebrauch müssen die Reagenzienfläschchen wieder fest mit den zugehörigen Deckeln verschlossen werden.

Kreuzkontaminationen von Proben oder Reagenzien können zu widersprüchlichen Testergebnissen führen und müssen durch Anwendung konsistenter Pipettier Techniken vermieden werden.

8 Vorbereitung

8.1 Vorbereitung von Reagenzien

Alle Komponenten müssen vor Gebrauch für mindestens 30 min auf Raumtemperatur (RT: 18 °C bis 25 °C) gebracht werden, mit Ausnahme des Präzipitationspuffers, der bis zur Verwendung bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden muss. Flüssige Reagenzien müssen zur Homogenisierung gut durchmischt werden.

8.1.1 Kalibratoren

Die Kalibratoren sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden. Kalibratoren müssen in jedem Testansatz mitgeführt werden.

8.1.2 Kontrollen

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden. Kontrollen müssen in jedem Testansatz mitgeführt werden. Alternativ können Laboratorien auch eigene Kontrollen validieren und verwenden.

8.1.3 Rekonstitutionspuffer

Der Rekonstitutionspuffer ist gebrauchsfertig und dient zur Rekonstituierung des Tracers und Protein A.

8.1.4 Tracer

Der Tracer ist lyophilisiert und muss mit 2,6 mL Rekonstitutionspuffer pro Fläschchen rekonstituiert werden. Der rekonstituierte Tracer ist bei 2 °C bis 8 °C gelagert für zwei Wochen haltbar.

8.1.5 Protein A

Protein A ist lyophilisiert und muss mit 2,6 mL Rekonstitutionspuffer pro Fläschchen rekonstituiert werden. Die rekonstituierte Protein A Lösung ist bei 2 °C bis 8 °C gelagert für zwei Wochen haltbar.

8.1.6 Präzipitationspuffer

Der Präzipitationspuffer ist gebrauchsfertig und muss bis zur Verwendung bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

8.2 Vorbereitung der Proben

8.2.1 Probenmaterial

Die Verwendung frischer Serumproben aus venös entnommenem Blut wird empfohlen. Ikterische, lipämische, hämolytische oder bakteriell kontaminierte Proben sollten nicht verwendet werden. Unlösliche Bestandteile sollten durch Zentrifugation aus der Probe entfernt werden. Die Proben dürfen nicht thermisch inaktiviert werden.

8.2.2 Probenlagerung

Proben können bis zu drei Tagen bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben erfordert -20 °C. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Zur Mehrfachverwendung sollten die Proben aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt werden.

9 Durchführung

9.1 Ablaufschema

Zur Durchführung des Immunoassays werden Spitzbodenröhrchen empfohlen. Eine ausreichende Anzahl an Probenröhrchen für Kalibratoren, Kontrollen und Proben muss vorbereitet werden inklusive eines zusätzlichen Probenröhrchens zur Analyse des isolierten Tracers als Referenz zur Bestimmung der Totalradioaktivität. Die angegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen müssen eingehalten und starke Zeitverschiebungen beim Pipettieren von Proben und Reagenzien vermieden werden.

Schritt	Beschreibung
1. Zugabe von Kalibratoren, Kontrollen und unverdünnten Proben	Zugabe von 20 μ L gebrauchsfertiger Kalibratoren, Kontrollen und unverdünnten Proben pro Probenröhrchen. Vorbereiten eines zusätzlichen, Probenröhrchens für isoliertes Tracer Material zur Bestimmung der Totalaktivität T als Referenz.
2. Zugabe des Tracers	Zugabe von 50 μ L Tracer Material (aus D und H) pro Probenröhrchen inklusive des zusätzlichen Probenröhrchens zur Bestimmung der Totalaktivität T als Referenz. Das zusätzliche Probenröhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität T als Referenz bis zur Messung beiseite stellen.
3. Inkubation	Inkubieren der Röhrchen für 2 Stunden bei RT
4. Zugabe von Protein A	Zugabe von 50 μ L Protein A (aus L und H) pro Röhrchen und vortexen
5. Inkubation	Inkubieren der Röhrchen für 1 Stunde bei RT
6. Zugabe des Präzipitationspuffers	Zugabe von 1,0 mL kaltem Präzipitationspuffer zu jedem Röhrchen und vortexen
7. Zentrifugation	Zentrifugieren der Röhrchen für 30 min bei 2 °C bis 8 °C und 2000 x g
8. Dekantieren	Dekantieren oder Absaugen des Überstands aller Probenröhrchen Zum Entfernen der Restflüssigkeit, die Probenröhrchen kopfüber für 30 min auf saufähiges Papier stellen.
9. Analyse	Messung der Radioaktivität aller Probenröhrchen inklusive des Referenzröhrchens T mit einem γ -Counter und einer empfohlenen Messzeit von 1 min.

10 Auswertung

10.1 Metrologische Rückverfolgbarkeit

Der Immunoassay wurde an einer internen Referenzprobe kalibriert. Quantitative Ergebnisse werden in U/mL angegeben.

10.2 Quantitative Auswertung

Zur Erstellung einer Standardkurve wird die gemessene Radioaktivität (counts per minute, cpm) der Kalibratoren gegen ihre Antikörperaktivitäten aufgetragen und mit Hilfe spline smoothing korreliert. Unter Verwendung der so generierten Standardkurve können Antikörperaktivitäten unbekannter Proben direkt aus ihrer gemessenen Radioaktivität (counts per minute; cpm) abgeleitet werden.

Alternativ kann die quantitative Auswertung auch auf Basis der Bindungsraten B/T (%) erfolgen. Die Bindungsraten B/T (%) werden berechnet durch Division der gemessenen Radioaktivität (counts per minute; cpm) aller Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben mit der Totalradioaktivität T. Zur Erstellung einer Standardkurve wird die Bindungsraten B/T (%) der Kalibratoren gegen ihre Antikörperaktivitäten aufgetragen und mit Hilfe spline smoothing korreliert. Unter Verwendung der so generierten Standardkurve können Antikörperaktivitäten unbekannter Proben direkt aus ihrer gemessenen Bindungsraten B/T (%) abgeleitet werden.

10.3 Validitätskriterien

Ein Testlauf ist valide, wenn die nachfolgenden Validitätskriterien erfüllt sind:

- cpm or B/T (%) CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4 < CAL 5 < CAL 6
- Die Kontrollen müssen eine Antikörperaktivität im Gültigkeitsbereich aufweisen, der auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben ist.

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf nicht valide und muss wiederholt werden.

10.4 Problembehandlung

Im Falle eines invaliden Testlaufs sollten die Haltbarkeiten und Lagerungsbedingungen, die Inkubationszeiten und –temperaturen sowie die präzise Kalibrierung der Pipetten und aller anderen Geräte überprüft werden. Sollte sich kein Grund für den invaliden Testlauf finden, kontaktieren Sie bitte den Anbieter oder Hersteller des Produkts.

10.5 Referenzbereiche

Die Referenzbereiche sind nachfolgend angegeben:

	Interpretation
Antikörperaktivität < 1 U/mL	negativ
Antikörperaktivität 1 - 2 U/mL	grenzwertig
Antikörperaktivität > 2 U/mL	positiv

Aufgrund der unterschiedlichen Seroprävalenzen in einzelnen Regionen sollte jedes Labor den Grenzwertbereich durch eigene Analysen verifizieren und ggf. anpassen.

10.6 Interpretation der Ergebnisse

Ein positives Ergebnis bestätigt die Anwesenheit spezifischer Antikörper. Ein negatives Ergebnis bestätigt die Abwesenheit spezifischer Antikörper, schließt jedoch eine Autoimmunreaktion nicht aus. Im Fall eines grenzwertigen Ergebnisses ist keine sichere Bewertung der Patientenprobe möglich.

10.7 Einschränkungen der Methode

Probanden mit der seltenen neuromuskulären Funktionsstörung Stiffman-Syndrom (SMS) können ebenfalls GAD₆₅-Autoantikörper in Serum- und Liquorproben aufweisen. Diese Antikörper erkennen eine Kombination von linearen und räumlichen Epitopen von GAD₆₅ und GAD₆₇, während Autoantikörper beim Typ 1 Diabetes überwiegend gegen Konformationsepitope von GAD₆₅ gerichtet sind.

Die Interpretation der Testergebnisse muss stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild des Patienten erfolgen. Eine Diagnose sollte nicht allein auf den Ergebnissen einer individuellen diagnostischen Methode erfolgen, sondern immer unter Berücksichtigung aller klinischen und laboratoriumsmedizinischen Befunde erstellt werden. Zur Bestätigung sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

11 Leistungsmerkmale

11.1 Analytische Leistungsmerkmale

11.1.1 Analytische Sensitivität und Spezifität

Der Limit of Quantitation (LoQ) wurde mit einer Intraassay Varianz von 10 % und einer Interassay Varianz von 20 % korreliert.

	Analytische Sensitivität
Limit of Quantitation (LoQ)	0,7 U/mL

Durch die hohe Qualität des Tracers ist im direkten Assay (s.a. Testprinzip) gesichert, dass nur anti-GAD₆₅-Antikörper erfasst werden und nachweisbare Kreuzreaktionen mit Autoantikörpern gegen Thyreoglobulin, der thyreoidalen Peroxidase, dem TSH-Rezeptor, den IA₂ als auch IAA Antikörpern nicht vorhanden sind.

11.1.2 Präzision

Die Präzision der Messergebnisse wurde durch die Bestimmung der Intra- und Interassay Varianz durch Analyse mehrerer Proben mit unterschiedlichen Antikörperaktivitäten ermittelt.

	Intraassay Präzision		Interassay Präzision	
	U/mL	VK (%)	U/mL	VK (%)
Probe 1	0,8	10,0	0,6	20,7
Probe 2	8,2	6,8	8,4	5,2
Probe 3	45,9	1,3	45,6	1,1

11.1.3 Messbereich

Im Rahmen umfangreicher Leistungsbewertungsstudie wurden die Genauigkeit, Richtigkeit, Präzision, Linearität und Wiederfindung im Messbereich zwischen dem LoQ und dem höchsten Kalibrator nachgewiesen. Proben mit Ergebnissen oberhalb des höchsten Kalibrators sollten mit >max angegeben werden. Proben, mit Ergebnissen unterhalb des LoQ, sollten mit <min angegeben werden. Patientenproben mit Messwerten oberhalb des höchsten Kalibrators können in einer höheren Verdünnung analysiert werden. Zur Quantifizierung sind die erhaltenen Antikörperaktivitäten dann mit dem zusätzlichen Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

11.2 Diagnostische Leistungsmerkmale

11.2.1 Diagnostische Genauigkeit

Sensitivität und Spezifität wurden durch die Analyse von 65 Proben von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und 392 Proben unselektierter Blutspender ermittelt.

	Diagnostische Leistung
Sensitivität	86,2 %
Spezifität	96,7 %

12 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Das Produkt ist ausschließlich zur in vitro Diagnostik und nur für die Anwendung durch qualifiziertes, autorisiertes und geschultes Fachpersonal vorgesehen. Alle Testkomponenten und menschliche Proben sollten als potenziell gefährlich mit entsprechender Vorsicht behandelt werden. Gute Laborpraxis

(GLP) und alle relevanten Vorschriften sollten eingehalten werden

Sollte das Produkt beschädigt oder die Produktinformationen einschließlich der Etikettierung falsch oder fehlerhaft sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller oder den Lieferanten.

Das Produkt enthält Präparationen menschlichen und / oder tierischen Ursprungs. Obwohl alle Materialien aus humanen Körperflüssigkeiten oder Organen zur Herstellung von Komponenten negativ auf HBsAg (Hepatitis B-Virus-surface Antigen), anti-HIV und anti-HCV Antikörper getestet wurden, müssen alle Komponenten und Patientenproben gemäß nationalen Gesetzen und anzuwendenden Richtlinien zur Biologischen Sicherheit als potenziell gefährlich eingestuft und entsprechend behandelt werden.

Da das Produkt potenziell gefährliche und / oder radioaktive Materialien enthält, sollten die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden: Beim Umgang mit Kitmaterial oder Proben nicht rauchen, essen oder trinken. Direkten Kontakt mit Kitmaterial oder Proben durch das Tragen von Schutzhandschuhen, Laborkittel und Schutzbrille vermeiden. Niemals Material mit dem Mund pipettieren. Verschüttetes Material sofort aufnehmen und die betroffene Oberfläche gründlich mit einem Dekontaminationsmittel reinigen. Nach Gebrauch gründlich Hände waschen.

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (< 0,1 %) als Konservierungsmittel und dürfen nicht verschluckt werden oder mit Haut oder Schleimhaut in Berührung kommen. Der möglichen Bildung von Schwermetallaziden in der Drainage ist durch ausreichende Spülung mit Wasser vorzubeugen.

Die Angaben im Sicherheitsdatenblatt zu möglichen Gefahren, Erste-Hilfe-Maßnahmen, Maßnahmen bei unbeabsichtigter Freisetzung großer Mengen, Handhabung und Lagerung, persönliche Schutzausrüstung, Hinweise zur Entsorgung sowie Angaben zur Toxikologie sind zu beachten.

Jeder schwerwiegende Vorfall im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats zu melden, in dem der Benutzer und / oder der Patient ansässig sind.

13 Entsorgung

Zur Dekontamination und Entsorgung müssen die Empfehlungen der CDC sowie die jeweils geltenden lokalen und nationalen Richtlinien und gesetzlichen Vorschriften eingehalten werden. Proben, potentiell kontaminierte Materialien und infektiöse Abfälle müssen, z. B. durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C, dekontaminiert werden.

Einige der Reagenzien enthalten radioaktives Material. Kontaminierte Tücher, Röhrchen, Tischabdeckungen, Handschuhe usw. müssen in einem speziell gekennzeichneten Behälter entsorgt werden. Entsorgen Sie flüssige und feste radioaktive Abfälle nur so, wie es von den Bundes-, Landes- oder örtlichen Behörden und Vorschriften erlaubt ist. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Produkts, radioaktives Material in Übereinstimmung mit den nationalen gesetzlichen Vorschriften oder anderen Anweisungen der örtlichen Behörden zu handhaben.

14 References

- 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, Hatzigelaki 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 Symbols

	Hersteller
	CE-Konformitätskennzeichnung
	In vitro Diagnostikum
	Artikelnummer
	Unique device identifier
	Chargennummer
	Begrenzung der Lagertemperatur
	Verwendbar bis
	Arbeitsanleitung beachten
	Ausreichend für n Bestimmungen
	Nicht wiederverwenden
	Achtung
	Biologisches Risiko
	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen
	Radioaktives Material oder ionisierende Strahlung
	Kalibrator
	Kontrolle
	Tracer
	Rekonstitutionspuffer / Puffer
	Präzipitationspuffer
	Protein A Lösung

16 Änderungen

Änderungen in vorliegender Gebrauchsanweisung

Aktuelle Version	014/03.2023
Zusammenfassung der Änderungen	Redaktionelle Änderungen in Kapitel 2