RSR

ElisaRSR™ GADAb

Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) Autoantibody ELISA Kit von RSR – Gebrauchsanweisung

CE

RSR Limited
Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff
CF14 5DU United Kingdom
Tel.: +44 29 2068 9299 Fax: +44 29 2075 7770
Email: info@rsrltd.com Website: www.rsrltd.com

EC REP Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr., Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta.

ZWECKBESTIMMUNG

Das RSR GAD_{65}-Autoantikörper (GAD-Ak) ELISA Kit ist ausschließlich für den Einsatz durch Fachpersonal zur quantitativen Bestimmung von GAD-Ak im menschlichen Serum bestimmt. Autoantikörper gegen Antigene der Betazellen der Bauchspeicheldrüse sind wichtige serologische Marker für Typ-1-Diabetes mellitus (Typ-1-DM). Zu den von diesen Antikörpern erkannten Antigenen gehören Insulin, Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD_{65}-kDa-Isoform), das Inselzellantigen IA-2 oder ICA-512 sowie der Zinktransporter 8 (ZnT8).

LITERATURLISTE

H. Brooking et al
A Sensitive non-isotopic assay for GAD_{65} autoantibodies
Clinica Chimica Acta 2003 331:55-59

S. Chen et al
Sensitive non-isotopic assays for autoantibodies to IA2 and to a combination of both IA2 and GAD_{65}.
Clinica Chimica Acta 2005 357:74-83

E. Nilson et al
Calcium addition to EDTA plasma eliminates falsely positive results in the RSR GADAb ELISA.
Clinica Chimica Acta 388 (2008) 130-134

K. Rahmati et al
A Comparison of Serum and EDTA Plasma in the Measurement of Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodies (GADA) and Autoantibodies to Islet Antigen-2 (IA-2A) Using the RSR Radioimmunoassay (RIA) and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kits.
Clin. Lab. 2008 54:227-235

C. Törn et al
Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2.
Diabetologia 2008 51:846-852

PATENTE

Folgende Patente finden Anwendung:

USA Patente US 8,129,132 B2 und US 10,481,156 B2.

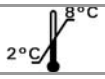
TESTPRINZIP

Beim GAD-Ak ELISA von RSR können GAD-Ak in Patientenseren, Kalibratoren und Kontrollen mit GAD_{65}, gebunden in den Vertiefungen der ELISA-Platte, interagieren. Nach einer 1-stündigen Inkubationszeit werden die Proben verworfen, wobei die GAD-Ak an das auf der Platte immobilisierte GAD_{65} gebunden bleiben. In einem zweiten Inkubationsschritt wird GAD_{65}-Biotin zugegeben, wobei die GAD-Ak mit ihrer divalenten Fähigkeit, eine Brücke zwischen der auf der Platte immobilisierten GAD_{65} und dem GAD_{65}-Biotin bilden. In einem dritten Inkubationsschritt wird Streptavidin-Peroxidase, welches spezifisch an Biotin bindet, zugegeben, um dadurch die Menge an gebundenem GAD_{65}-Biotin bestimmen zu können. Überschüssige, ungebundene Streptavidin-Peroxidase wird anschließend weggewaschen, und die Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) resultiert in der Bildung einer blauen Färbung. Diese Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung gestoppt, wodurch sich der Inhalt der Vertiefungen gelb färbt. Anschließend wird mit einem ELISA-Plattenlesegerät die Extinktion des gelben Reaktionsgemischs bei 450 nm und 405 nm gemessen. Eine höhere Extinktion weist auf das Vorhandensein von GAD-Ak in der Testprobe hin. Die Messung bei 405 nm ermöglicht die Quantifizierung hoher Extinktionswerte (und sollte für Konzentrationen von 120 u/mL oder mehr verwendet werden). Niedrige Werte (unter 10 u/mL) sollten anhand der Kalibrierungskurve bei 450 nm abgelesen werden. Ist eine Messung bei nur einer Wellenlänge möglich, kann 405 nm verwendet werden. Der Messbereich liegt zwischen 5 - 2000 u/mL (Einheiten gemäß NIBSC 97/550).

AUFBEWAHRUNG UND VORBEREITUNG DER SERUMPROBEN

Zu analysierende Seren sollten bald nach der Entnahme getestet oder, vorzugsweise als Aliquots, bei oder unter −20°C gelagert werden. 50 µL reichen für einen Assay (Doppelbestimmung mit je 25 µL). Wiederholtes Einfrieren und Auftauen, sowie Erhöhungen in der Lagertemperatur sollten vermieden werden. Lipämische oder hämolysierte Serumproben sollten nicht verwendet werden. Es sollte kein Plasma für den Test verwendet werden. Falls erforderlich, die Testseren auf Raumtemperatur bringen und vorsichtig mischen, um eine homogene Durchmischung zu gewährleisten. Zentrifugieren Sie das Serum vor dem Test (vorzugsweise 5 Minuten bei 10−15.000 rpm in einer Mikrozentrifuge), um Partikel zu entfernen. Bitte lassen Sie diesen Zentrifugationsschritt nicht aus, wenn die Seren trüb sind oder Partikel enthalten.

SYMBOLE

Symbol	Bedeutung
CE	EG-Konformitätserklärung
IVD	In-vitro-Diagnostikum
REF	Katalognummer
LOT	Chargennummer
	Gebrauchsanweisung beachten
	Hersteller
	Inhalt ausreichend für X Bestimmungen
	Ungeöffnet verwendbar bis
	Begrenzung der Lagertemperatur
CONTROL -	Negative Control
CONTROL +	Positive Control

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

Pipetten zum Dispensieren von 25 µL und 100 µL.
Gefäße zum Messen verschiedener Volumina, zum Rekonstituieren oder Verdünnen der mitgelieferten Reagenzien.
Reinstwasser.
ELISA-Plattenlesegerät, geeignet für 96-Well-Formate und in der Lage bei 450 nm und 405 nm zu messen.
ELISA-Plattenschüttler mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 rpm (kein Orbitalschüttler).
ELISA-Plattenabdeckung.

VORBEREITUNG DER MITGELIEFERTERN REAGENZIEN

Ungeöffnete Kits und Komponenten bei 2-8°C lagern.

A	**GAD$_{65}$ Coated Wells** 12 teilbare Streifen mit je 8 Vertiefungen (insgesamt 96) in einem Rahmen und in einem Folienbeutel versiegelt. Vor dem Öffnen mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen.
	Stellen Sie sicher, dass die benötigten Vertiefungen fest in den mitgelieferten Rahmen eingepasst sind. Nach dem Öffnen unbenötigte Vertiefungen wieder in den mitgelieferten Original-Folienbeutel mit Trockenmittel geben und mit Klebeband verschließen. Den Folienbeutel in den mitgelieferten selbstverschließenden Plastikbeutel legen und bei 2-8°C bis zu 16 Wochen lagern.
B1-6	**Calibrators** 5, 18, 35, 120, 250, 2000 u/mL (Einheiten gemäß NIBSC 97/550) 6 x 0,7 mL Gebrauchsfertig
C	**Positive Control** **(Siehe Etikett für Konzentrationsbereich)** 0,7 mL Gebrauchsfertig
D	**Negative Control** 0,7 mL Gebrauchsfertig
E	**GAD$_{65}$-Biotin** 3 Fläschchen Lyophilisiert
	Jedes Fläschchen mit 5,5 mL Reconstitution Buffer for GAD$_{65}$-Biotin (F) rekonstituieren. Wenn mehr als ein Fläschchen verwendet wird, die Fläschchen poolen und vor Gebrauch vorsichtig mischen. Bis zu 3 Tage nach dem Rekonstituieren bei 2-8 °C lagern.
F	**Reconstitution Buffer for GAD$_{65}$-Biotin** 2 x 15 mL, rot gefärbt Gebrauchsfertig
G	**Streptavidin Peroxidase (SA-POD)** 1 x 0,7 mL Konzentrat
	Mit Diluent for SA-POD (H) 1 in 20 verdünnen. Zum Beispiel 0,5 mL (G) + 9,5 mL (H). Nach dem Verdünnen bis zu 16 Wochen bei 2-8°C lagern.
H	**Diluent for SA-POD** 15 mL Gebrauchsfertig
I	**Peroxidase Substrate (TMB)** 15 mL Gebrauchsfertig
J	**Concentrated Wash Solution** 125 mL Konzentrat
	Vor Gebrauch 10x mit Reinstwasser verdünnen. Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum des Kits lagern.
K	**Stop Solution** 12 mL Gebrauchsfertig

TESTVERFAHREN

Alle Reagenzien vor Gebrauch mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen. Für die Schritte 4, 7, 10 und 11 wird ein Mehrfachdipenser (z. B. Eppendorf Multipette®) empfohlen.

1.	Je **25 µL** Patientenseren, Calibrators (B1-6) und Controls (C und D) in die entsprechenden Vertiefungen (A) pipettieren (Doppelbestimmungen werden empfohlen), eine Vertiefung als Blank leer lassen (s. Schritt 12).

2.	Die Vertiefungen abdecken und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler schütteln (500 rpm).
3.	Mit einem ELISA-Plattenwascher die Vertiefungen dreimal absaugen und mit verdünnter Wash Solution (J) waschen. Sollte kein Plattenwascher verfügbar sein, den Inhalt der Vertiefungen durch rasches Umdrehen über einem geeigneten Behälter entleeren, dreimal manuell waschen und abschließend die Vertiefungen umgedreht auf einem sauberen, trockenen, saugfähigen Tuch vorsichtig ausklopfen.
4.	Je **100 µL** rekonstituiertes GAD_{65}-Biotin (E) in jede Vertiefung pipettieren (außer Blank). Achten Sie darauf, dass beim Hinzufügen nichts aus den Vertiefungen spritzt.
5.	Die Vertiefungen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler (500 rpm) inkubieren.
6.	Waschschritt 3 wiederholen.
7.	Je **100 µL** verdünntes SA-POD (G) in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren.
8.	Die Vertiefungen abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler (500 rpm) inkubieren.
9.	Waschschritt 3 wiederholen. Beim manuellen Waschen einen zusätzlichen Waschschritt mit Reinstwasser durchführen (um Schaumreste zu entfernen), bevor die Vertiefungen umgedreht trockengeklopft werden.
10.	Je **100 µL** TMB (I) in jede Vertiefung (einschließlich Blank) pipettieren und 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubieren.
11.	Je **100 µL** Stop Solution (K) in jede Vertiefung (einschließlich Blank) pipettieren und die Platte ca. 5 Sekunden auf einem Plattenschüttler schütteln. Achten Sie darauf, dass die Dauer der Substratinkubation bei allen Vertiefungen gleich lang ist.
12.	Innerhalb von 15 Minuten die Extinktion jeder Vertiefung bei 450nm und 405nm mit einem ELISA-Plattenlesegerät bestimmen, dabei bei jeder Vertiefung den Wert des Blanks abziehen (Vertiefung mit **nur 100 µL** TMB (I) und **100 µL** Stop Solution (K).

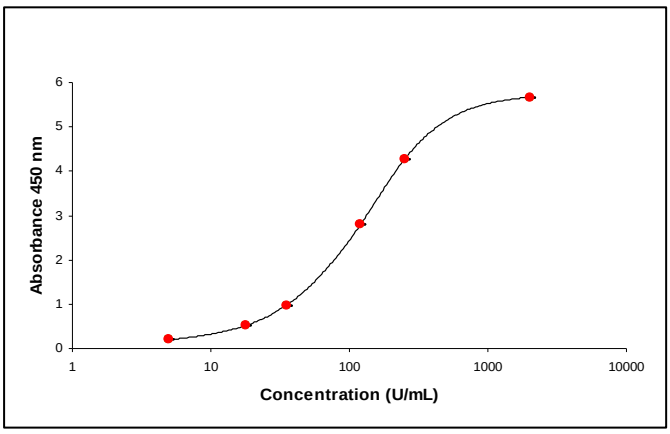
TESTAUSWERTUNG

Eine Kalibrierkurve kann erstellt werden, indem die Konzentration der Calibrators auf der x-Achse (logarithmische Skala) gegen die Extinktion der Calibrators auf der y-Achse (lineare Skala) aufgetragen wird. Die GAD-Ak-Konzentrationen in den Patientenseren können dann von der Kalibrierungskurve abgelesen werden [aufgetragen bei RSR als Spline-Log/Lin-Kurve (Glättungsfaktor = 0)]. Andere Datenreduktionssysteme können verwendet werden. Der Negative Control (D) kann ein Wert von 0,5 u/mL zugewiesen werden im Rahmen einer computergestützten Verarbeitung der Testergebnisse. Die meisten Testseren weisen Werte unter 250 u/mL auf, sodass der Calibrator mit 2000 u/mL nicht immer mitgeführt werden muss. Proben mit hohen Antikörperkonzentrationen können in GAD-Ak-negativem Serum oder der Negative Control des Kits (D) verdünnt werden. Beispielsweise ergeben 20 µL Probe plus 180 µL Verdünnungsmatrix eine 10-fache Verdünnung. Andere Verdünnungen (z. B. 100-fach) können ausgehend von einer 10-fachen Verdünnung oder anderweitig nach Bedarf hergestellt werden. Einige Seren lassen sich nicht linear entsprechend den Kit-Kalibratoren (standardisiert nach NIBSC 97/550) verdünnen.

TYPISCHE ERGEBNISSE (Nur als Beispiel, nicht zur Berechnung der tatsächlichen Ergebnisse verwenden)

Calibrator	A450 nm	Konz. u/mL	A405 nm	Konz u/mL
B1	0,199	**5**	0,061	**5**
B2	0,527	**18**	0,164	**18**
B3	0,975	**35**	0,301	**35**
B4	2,794	**120**	0,843	**120**
B5	4,264	**250**	1,254	**250**
B6	5,671	**2000**	1,668	**2000**
Negative Control (D)	0,035	0	0,012	0
Positive Control (C)	1,374	49,2	0,418	49,6

Extinktionswerte bei 405nm gemessen, können in 450nm Extinktionswerte umgerechnet werden, indem sie mit einem entsprechenden Faktor multipliziert werden (3,4 im Fall von bei RSR verwendeten Geräten).



ASSAY CUT-OFF

Cut-off	u/mL
Negativ	< 5 u/mL
Positiv	≥ 5 u/mL

Dieser Cut-off wurde bei RSR validiert. Jedoch sollte jedes Labor seinen eigenen normal und pathologische Referenzbereiche für GAD-Ak-Spiegel festlegen. Außerdem wird empfohlen, dass jedes Labor sein eigenes Panel an Kontrollproben im Assay mitführt.

KLINISCHE BEWERTUNG

Klinische Spezifität und Sensitivität

In der DASP 2005 Studie erreichte das RSR GADAb ELISA Kit eine Spezifität von 98% (n = 100) und eine Sensitivität von 92% (n = 50).

Untere Nachweisgrenze

Die Negative Control des Kits wurde 20 Mal getestet, und der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden berechnet. Die untere Nachweisgrenze bei +2 Standardabweichungen betrug 0,57 u/mL.

Inter Assay Präzision

Probe	u/mL (n = 20)	VK (%)
A	97	5,7
B	21	5,2
C	5,7	6,4

Intra Assay Präzision

Probe	u/mL (n = 25)	VK (%)
1	97	7,3
2	20	8,5
3	7,0	3,5

Klinische Genauigkeit

Bei der Analyse von Serumproben von Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen als Typ-1-Diabetes zeigte sich keine Beeinträchtigung durch Autoantikörper gegen Thyroglobulin oder Schilddrüsenperoxidase (n = 10) oder den TSH-Rezeptor (n = 20). Eine dsDNA-positive Probe (n = 10), und eine Rheumafaktor-positive Probe (n = 30), waren positiv auf GAD-Ak.

Interferenzen

Es wurde keine Interferenz beobachtet, wenn Proben mit den folgenden Substanzen versetzt wurden: Hämoglobin bei 5 mg/mL, Bilirubin bei 20 mg/dL oder Intralipid bei bis zu 3000 mg/dL.

SICHERHEITSHINWEISE

Streptavidin Peroxidase (SA-POD)

Signalwort: Achtung



Gefahrenhinweis(e)

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Sicherheitshinweis(e)

P261: Einatmen von Nebel/Aerosol vermeiden.
P272: Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P302 + P352: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P501: Inhalt/Behälter gemäß den lokalen, regionalen, nationalen und/oder internationalen Vorschriften bei einer Sammelstelle für Gefahr- oder Sonderabfälle zuführen.

Peroxidase Substrate (TMB)

Signalwort: Gefahr



Gefahrenhinweis(e)

H360D: Kann das Kind im Mutterleib schädigen

Sicherheitshinweis(e)

P202: Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P308 + P313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P501: Inhalt/Behälter gemäß den lokalen, regionalen, nationalen und/oder internationalen Vorschriften bei einer Sammelstelle für Gefahr- oder Sonderabfälle zuführen.

Diluent for SA-POD

Gefahrenhinweis(e)

EUH208: Enthält 2-Chloracetamid. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Dieses Kit ist ausschließlich für den *In-vitro*-Gebrauch durch Fachpersonal bestimmt. Befolgen Sie die Anweisungen sorgfältig. Beachten Sie die auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten sowie die angegebene Haltbarkeitsdauer für beschichtete Vertiefungen, rekonstituierte und verdünnte Reagenzien. Ausführlichere Sicherheitshinweise finden Sie im Sicherheitsdatenblatt. Das bei der Herstellung des Kits verwendete Material menschlichen Ursprungs wurde getestet und als nicht reaktiv gegenüber HIV1- und 2- und HCV-Antikörpern sowie HBsAg befunden; es sollte dennoch als potenziell infektiös behandelt werden. Waschen Sie sich bei einer Kontamination und vor dem Verlassen des Labors gründlich die Hände. Sterilisieren Sie alle potenziell kontaminierten Abfälle, einschließlich der Testproben, vor der Entsorgung. Das bei der Herstellung des Kits verwendete Material tierischen Ursprungs stammt von als gesund zertifizierten Tieren, sollte jedoch als potenziell infektiös behandelt werden. Einige Komponenten enthalten geringe Mengen Natriumazid als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie wie bei allen Kit-Komponenten die Einnahme, das Einatmen, die Injektion sowie der Kontakt mit Haut, Augen und Kleidung. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abwassersystem, indem Sie alle Kit-Komponenten mit reichlich Wasser nachspülen.

ASSAY PLAN

Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.	
Pipettieren:	**25 µL** Calibrators (B1-6), Controls (C und D) und Patientenserum (außer Blank)
Inkubieren:	1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler bei 500 rpm
Aspirieren/Dekantieren:	ELISA-Platte (A)
Waschen:	ELISA-Platte (A) drei Mal und auf saugfähigem Material trockenklopfen[1]
Pipettieren:	**100 µL** GAD_{65}-Biotin (E) (rekonstitutiert) in jede Vertiefung (außer Blank)
Inkubieren:	1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler bei 500 rpm
Aspirieren/Dekantieren:	ELISA-Platte (A)
Waschen:	ELISA-Platte (A) drei Mal und auf saugfähigem Material trockenklopfen[1]
Pipettieren:	**100 µL** SA-POD (G) (verdünnt 1:20) in jede Vertiefung (außer Blank)
Inkubieren:	20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler bei 500 rpm
Aspirieren/Dekantieren:	ELISA-Platte (A)
Waschen:	ELISA-Platte (A) drei Mal, mit Reinstwasser spülen und auf saugfähigem Material trockenklopfen[1]
Pipettieren:	**100 µL** TMB (I) in jede Vertiefung (einschließlich Blank)
Inkubieren:	20 Minuten bei Raumtemperatur **im Dunkeln (ohne Schütteln)**
Pipettieren:	**100 µL** Stop Solution (K) in jede Vertiefung (einschließlich blank) und für 5 Sekunden schütteln
Innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stop Solution die Extinktion bei 450nm und bei 405nm messen	
[1] Wenn ein automatischer Plattenwascher verwendet wird, ist es nicht erforderlich, die Platten nach dem Waschen trockenzuklopfen. Bei Verwendung eines automatischen Plattenwaschers kann der Spülgang mit Reinstwasser entfallen.	