

R.S.R.
Limited

**AUTOANTICORPO ANTI-ÁCIDO GLUTÂMICO
DESCARBOXILASE**

AVENUE PARK
PENTWYN
CARDIFF
CF 23 8HE
UNITED KINGDOM

TELEPHONE: (029) 2073 2076
FACSIMILE: (029) 2073 2704

Revisão: 19/04/2007

FINALIDADE DO ENSAIO

O kit auto-anticorpo GAD RSR deve ser utilizado por profissionais qualificados, e é destinado a dosagem quantitativa de auto-anticorpos GAD (GAD Ab) em soro humano.

Auto-anticorpos contra antígenos de células beta pancreáticas são marcadores sorológicos importantes para diabetes melitus tipo I. Os antígenos reconhecidos por estes anticorpos incluem insulina, ácido glutâmico descarboxilase (isoforma GAD₆₅ KDa) e antígeno de células de ilhota IA2 ou ICA512.

REFERÊNCIAS

M.Powell et all
"Glutamic acid decarboxilase autoantibody assay using I¹²⁵ labelled recombinant GAD₆₅ produced in yeast"
Clin Chimica Acta 1996;256; 175-188

PRINCIPIO DO ENSAIO

No kit RSR de Radioimunoensaio (RIE) GADAb, anticorpos GAD no soro do paciente, calibradores e controles são incubados para interagir com o GAD₆₅ marcado com I¹²⁵. Após 2 horas de incubação, a proteína A em fase sólida é adicionada para precipitar o complexo de auto-anticorpo marcado GAD-GAD. Após mais uma incubação de 1 hora, é adicionado o tampão de ensaio a cada tubo e estes são centrifugados. Qualquer I¹²⁵ não ligado é removido do tubo por aspiração do sobrenadante. Os precipitados são então contados e a % de ligação determinada. Os níveis de radioatividade nas amostras são proporcionais à quantidade de anticorpo GAD presente nas amostras.

ARMAZENAMENTO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- Os soros que serão analisados devem ser ensaiados logo após a coleta ou armazenados, de preferência em alíquotas, a -20°C.
- 40µL são suficientes para 1 ensaio (determinações em duplicata)
- Repetidos ciclos de congelamento e degelo ou aumento da temperatura de armazenamento devem ser evitados.
- Armazenamento incorreto das amostras de soro pode provocar a perda de atividade do anticorpo.
- Não utilize amostras lipemicas ou hemolisadas.
- O plasma pode ser utilizado desde que EDTA seja utilizado como anti-coagulante.
- Quando necessário, descongele as amostras de soro a temperatura ambiente e homogeneize suavemente. Centrifugue a amostra antes do ensaio (de preferência por 5 minutos de 10-15,000 g em uma microcentrifuga) a fim de remover qualquer partícula em suspensão. Por favor, não omita a fase de centrifugação se a amostra de soro estiver turva ou contenha partículas.
- Por favor, **NÃO OMITA** esta etapa de centrifugação se o soro estiver turvo ou com partículas.

MATERIAIS FORNECIDOS NOS KITS 50 E 100 TUBOS

MATERIAL	50 TUBOS	100 TUBOS
I ¹²⁵ GAD ₆₅	1 x 2.6 mL	2 x 2.6 mL
Calibradores	7 x 0.15 mL	7 x 0.15 mL
Controles	2 x 0.15 mL	2 x 0.15 mL
Proteína A	1 x 2.6 mL	2 x 2.6 mL
Tampão de Ensaio	1 x 120 mL	1 x 120 mL

Materiais necessários não fornecidos no kit

- Tubos plástico de 3 mL
- Pipeta com capacidade de dispensar 20µL, 50µL, 1 mL e 2.6 mL.
- Centrifuga refrigerada com capacidade de 1500 xg
- Contador gama
- Vórtex

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES FORNECIDOS

A	GAD₆₅ marcado com I¹²⁵ - Liofilizado 50KBq/frasco (na fabricação)
	Reconstituir cada frasco com 2.6 mL de tampão de ensaio (D) e homogeneizar gentilmente até a sua dissolução. Uma vez reconstituído, armazenar de 2-8°C por até 2 semanas.
B1-7	Calibradores 0, 1, 3, 10, 30, 120, 300 u/mL (prontos para uso) (0.15 mL por frasco, unidades são unidades arbitrárias RSR; análise de NIBSC 97/550 no ensaio anticorpo GAD indica que 1 unidade RSR por mL é equivalente a 25 unidades por mL de 97/550)
C1-2	Controles Positivos (0.15 mL por frasco) Veja etiqueta para os intervalos de concentrações Pronto para uso
D	Tampão de Ensaio (120 mL) Pronto para uso. Armazenar de 2-8°C
E	Proteína A Liofilizada
	Reconstituir cada frasco com 2.6 mL de tampão de ensaio (D) e homogeneizar em vórtex até a dissolução. Homogeneize completamente antes do uso a fim de assegurar a uniformidade da suspensão. Uma vez reconstituído armazenar de 2-8°C.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Deixe todos os reagentes, exceto tampão de ensaio, a temperatura ambiente (20-25°C) por no mínimo 30 minutos antes da utilização no ensaio.

- Pipete 20 µL de soro dos pacientes, calibradores (B1-7) e controles (C1-2) em tubos de plástico marcados adequadamente em duplicata.
- Pipete 50 µL do GAD₆₅ I¹²⁵ (A) em cada tubo e dois tubos adicionais vazios para as contagens Totais.
- Cobrir os tubos com uma tampa adequada e homogeneizar agitando vigorosamente ou em vórtex.
- Incubar por 2 horas a temperatura ambiente (20-25 °C).
- Pipete 50 µL de proteína A (E) em cada tubo (excluindo os tubos de contagem total).
- Repita a etapa 3
- Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
- Pipete 1 mL de tampão de ensaio (D) gelado (2-8°C) em cada tubo (excluindo os tubos de contagem total) e centrifugue cada tubo a 1500 xg por 30 minutos a 4°C.
- Após centrifugação, aspirar ao sobrenadante e contar cada tubo por 1 minuto.

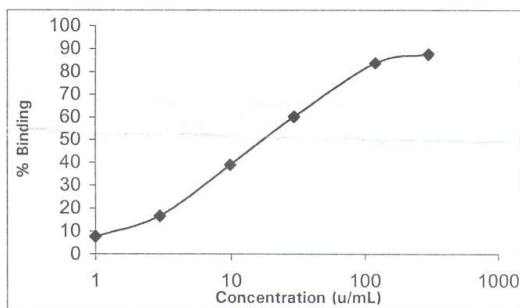
RESULTADO DO ENSAIO

Uma curva de calibração pode ser estabelecida colocando-se a concentração do calibrador o eixo-x (escala log) contra a % de ligação dos calibradores no eixo-y (escala linear). As concentrações do anticorpo GAD presente nas amostras dos pacientes, pode ser lida na curva de calibração. Vários sistemas de redução de dados podem ser utilizados para esta finalidade.

Na Tabela abaixo são apresentados os dados típicos do teste

Calibrador U/mL	% GAD I ¹²⁵ ligado	Conc. u/mL
Contagem Total		46.417
0	3.7	
1	7.7	
3	16.7	
10	39.0	
30	60.2	
120	83.7	

300	87.5	
Controle I	21.4	4.1
Controle II	56.1	24.0



CUT OFF DO ENSAIO

Cut OFF	u/mL
Negativo	≤ 1.0 u/mL
Positivo	> 1.0 u/mL

AVLIAÇÃO CLÍNICA

Especificidade e Sensibilidade Clínica

100 indivíduos saudáveis foram ensaiados com o kit GADAb RIE. 100% dos indivíduos foram identificados como negativos para auto-anticorpos GAD, apesar de que ocasionalmente indivíduos saudáveis possam ter níveis detectáveis de auto-anticorpos GAD. Amostras de 93 pacientes diagnosticados com diabetes tipo I foram ensaiados no kit GAD RIE. 71% foram identificados como positivos para auto-anticorpos GAD. No estudo DASP de 2005 o kit RIE Auto-anticorpos GAD RSR mostrou 95% de especificidade (n=100) e 84% de Sensibilidade (n=50).

Limite Mínimo de Detecção

O calibrador mais baixo (0 u/mL) foi ensaiado 20 vezes e a média e desvio padrão foi calculada. O limite mínimo de detecção com +2 desvios padrões foi de 0.11 u/mL.

Precisão Inter-ensaio

Amostra	u/mL (n=25)	C.V. (%)
1	6.1	4.9
2	42.9	7.0

Precisão Intra-ensaio

Amostra	u/mL (n=25)	C.V. (%)
1	6.4	3.6
2	42.7	3.7

Exatidão Clínica

Em um estudo de GADAb com diferentes grupos de pacientes utilizando-se o kit RSR GADAb, GADAb não foram detectados em pacientes com tireoidite de Hashimoto, miastenia gravis ou em pacientes com doença de Addison. 4% (n=27) dos pacientes com doença de Graves apresentaram-se positivos para GADAb.

Interferentes

Nenhum interferente foi observado quando as amostras foram inoculadas com os seguintes componentes:
Hemoglobina até 0.5 mg/mL ou intralipide até 3000 mg/dL.

Os dados contidos nesta bula devem ser utilizados apenas como guia. É recomendado que cada laboratório inclua seu próprio painel de amostras controles no ensaio. Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência patológicas e normais para níveis de GADAb.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Os dados contidos nestas instruções devem ser usados apenas como um guia.
- Recomenda-se que cada laboratório inclua seu próprio painel de amostras controles juntamente com os controles fornecidos no kit.
- Este kit é destinado ao uso *in vitro* por profissionais habilitados.
- Siga todas as instruções cuidadosamente.
- Armazene todos os reagentes de 2-8°C nas embalagens originais.
- Verifique as datas de validade impressas nas etiquetas assim como as estabilidades específicas para cada reagente reconstituído.

CUIDADO: MATERIAL RADIOATIVO

Consulte as regulamentações de radiação, padrões, e procedimentos aplicáveis para a sua facilidade em manusear, armazenar, e descartar materiais radioativos. Este material radioativo deve ser recebido, adquirido, e usado somente por médicos, laboratórios clínicos ou hospitais e somente deve ser usado para testes de laboratório ou clínicos *in vitro* que não envolvam administração interna ou externa do material, ou da radiação dele resultante, para seres humanos e animais. O seu recebimento, aquisição, uso e transferência estão sujeitos a regulamentações de cada país. Para minimizar os riscos de exposição à radiação, manuseie materiais radioativos como recomendado pela regulamentação padrão apropriada e no "Occupational Radiation Protection Safety Guide, Safety Standards Series N° RS-G-1.1," 1999, publicado pela "International Atomic Energy Agency".

As seguintes Boas Práticas de Laboratório universais devem ser observadas:

- Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos na área onde os materiais radioativos estiverem sendo manipulados.
- Não pipetar com a boca.
- Usar aventais e luvas descartáveis quando manipular materiais imunodiagnósticos.
- Lavar muito bem as mãos após manipular materiais imunodiagnósticos.
- Cobrir a superfície de trabalho com papel absorvente descartável.
- Limpar todos os respingos muito bem e imediatamente e descontaminar a superfície afetada.
- Evite a geração de aerossol.
- Providencie ventilação adequada.
- Manuseie e descarte os reagentes e materiais de acordo com a regulamentação aplicável.

AVISO: Material Potencialmente Nocivo à Saúde

Este kit contém alguns reagentes fabricados com material de fonte humana (ex. soro ou plasma) ou usados em conjunto com materiais de fonte humana. O material neste kit foi testado por métodos recomendados pela FDA e não se apresentaram reativos para anticorpo HIV-1/2, HCV e HBsAg. Nenhum método pode oferecer completa garantia de eliminação de riscos potenciais à saúde. Estes reagentes devem ser manipulados no Nível de Biosegurança 2, conforme recomendado para qualquer amostra de sangue ou soro potencialmente infecciosa no manual do CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Biosegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos), 4ª Edição, Abril 1999.

CUIDADO: Perigo Químico:

Alguns dos reagentes neste kit contém azida sódica como conservante em concentrações abaixo do limite permitido de <0.1%. Mesmo significativamente diluída azida sódica concentrada é um irritante para a pele e membranas mucosas e pode reagir com o cobre e chumbo das tubulações e formar azidas metálicas explosivas, especialmente se acumulada. Esta substância esta sob a forma diluída, e por isto, pode minimizar os riscos de exposição significativamente, mas não completamente. Evite contato com a pele, olhos, e roupas. Em caso de contato com qualquer um destes reagentes, lave a área completamente com água e procure orientação médica. Descarte todo material não radioativo e os reagentes sem risco de contaminação deixando correr uma grande quantidade de água a fim de prevenir a formação de produtos químicos perigosos no sistema de tubulação.

Para maiores informações a respeito de substâncias de risco pertencentes a este kit, por favor, consulte os componentes específicos nas FISPQs no site www.gendiaq.com.br ou solicite a informação.

Revisão-Assessoria: 15/05/2007

Biom. Resp.: Dra. Adriana Beatriz C. Almeida – CRBM: 3828
Registro do Produto M.S.: 10337680033

CONSERVAR ENTRE +2 E + 8°C

Importado e distribuído por:
Genese Produtos Diagnósticos Ltda.
Autorização de Funcionamento M.S.: 103376-8
Rua Diogo Vaz, 291 – CAMBUCI
CNPJ. 68.384.155/0001-02
CEP. 01527-020 - São Paulo - SP



Fabricado por:

RSR Ltd., Avenue Park, Pentwyn, Cardiff CF23
8HE, UK. Tel.+44-29-2073-2076 Fax +44-29-2073-2704
e-mail info@rsrltd.com

Atendimento ao consumidor - Fone (0xx)(11)-3341.6987

