





Arbeitsanleitung

anti - BPI - IgG - ELISA

**Enzymimmunoassay für die quantitative
Bestimmung von Bactericidal / Permeability
Increasing Protein (BPI) IgG-Antikörpern
in Serum und Plasma**

REF EA501/96

 12 x 8

 2 – 8 °C

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Telefon: 040 - 555 87 10 • Fax: 040 - 555 87 111
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • E-Mail: contact@dld-diagnostika.de

Januar 2008

Inhaltsverzeichnis

1. Klinische Bedeutung und Testprinzip	Seite	3
2. Vorsichtsmaßnahmen	Seite	4
3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien	Seite	4
4. Inhalt des Testbestecks	Seite	4
5. Vorbereitung der Reagenzien und Proben	Seite	6
6. Testdurchführung	Seite	7
7. Auswertung	Seite	8
8. Interpretation der Ergebnisse	Seite	9
9. Literatur	Seite	10
Pipettierschema	Seite	11

1. Klinische Bedeutung und Testprinzip

Bactericidal / Permeability Increasing Protein (BPI Protein) ist ein Bestandteil der azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten. Es ist ein stark positiv geladenes, an die Membran assoziiertes, zytotoxisches Protein von 55 kD, das nur in Zellen gefunden wird, die aus Myeloblasten stammen. Die hohe Toxizität des BPI ist ausschließlich gegen gram-negative Bakterien gerichtet.

Es gibt eine Anzahl von Serumproben, die in der indirekten Immunfluoreszenz eine positive Reaktion zeigen (cANCA oder pANCA-Muster), aber im anti-PR3- oder anti-MPO-ELISA negativ sind. Solche Proben können Antikörper gegen das BPI-Protein enthalten.

BPI ist - neben PR3 und MPO - das dritte wichtige Antigen in der ANCA-Diagnostik. Nach bisherigen Untersuchungen sind BPI-Antikörper mit zystischer Fibrose (Mukoviszidose), entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa, primärer sklerosierender Cholangitis und Autoimmun-Hepatitis assoziiert.

Der Anti-BPI-IgG-ELISA ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay. Während der Probeninkubation binden anti-BPI-Antikörper aus den verdünnten Patientenproben und Standards an hochreines BPI, das auf der Oberfläche von Mikrotiter-Vertiefungen immobilisiert ist.

Nach einem Waschschrift wird Peroxidase-markiertes anti-human IgG zugesetzt, das an die anti-BPI-Antikörper bindet. Nach einem weiteren Waschschrift wird die gebundene Enzymmenge über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Dabei entsteht zunächst ein blauer Farbstoff. Der Zusatz von Schwefelsäure stoppt diese Nachweisreaktion und bewirkt einen Farbumschlag nach Gelb.

Die Extinktionen der Proben werden dann mit einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gemessen und mit Hilfe der im Test eingesetzten Standardreihe in Konzentrationen umgerechnet.

2. Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.
- Die angegebenen Verfallsdaten sind unbedingt zu beachten.
- Die Reagenzien bis zur Verwendung bei 2 - 8 °C lagern.
- Während der Testdurchführung Einmal-Handschuhe tragen.
- Einige der Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid. Verschlucken und Berühren mit der Haut vermeiden.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg, HCV bzw. HIV I/II-Antikörper ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Zur Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien siehe Vorbereitung der Reagenzien.

Alle Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

4. Inhalt des Testbestecks

- | | |
|---|--------------|
| 4.1 MT-Streifen | 12 Stück |
| Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar
beschichtet mit hochreinem BPI-Protein | |
| 4.2 Enzymkonjugat | 1 Fläschchen |
| 12 ml, gebrauchsfertig
Anti-human IgG vom Kaninchen
konjugiert an Peroxidase, rot eingefärbt | |

- 4.3 **Standards** 6 Fläschchen
 je 1 ml vorverdünntes Humanserum, gebrauchsfertig
 Konzentrationen:

Standard	S1	S2	S3	S4	S5	S6
U/ml	3,12	6,25	12,5	25	50	100

- 4.4 **Positive Kontrolle** 1 Fläschchen
 1 ml vorverdünntes Humanserum, gebrauchsfertig
- 4.5 **Probenverdünnungspuffer** 1 Fläschchen
 15 ml, Konzentrat, blau eingefärbt
 Inhalt mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen.
- 4.6 **Waschpuffer** 1 Flasche
 75 ml, Konzentrat
 Inhalt mit bidest. Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- 4.7 **Substrat** 1 Fläschchen
 12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig
- 4.8 **Stopplösung** 1 Fläschchen
 12 ml, gebrauchsfertig
 Enthält 0,08M Schwefelsäure
 Vorsicht, ätzend!

Zusätzlich benötigte Materialien und nützliche Hilfsmittel

- Variable Präzisionspipetten mit auswechselbaren Spitzen (20, 100 µl)
- Multipette (Eppendorf) mit auswechselbaren Aufsätzen für unterschiedliche Volumina
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten

5. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

5.1 Patientenproben

Serum- bzw. Plasmaproben müssen bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren soll vermieden werden. Hämolytische Proben sollten nicht verwendet werden.

Die Patientenproben müssen für die Messung 1:51 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt werden (z.B.: 20 µl Probe + 1 ml Puffer). Verdünnte Proben, die für eine eventuelle Wiederholungsmessung aufbewahrt werden sollen, müssen ebenfalls eingefroren werden.

5.2 MT-Streifen

Mikrotiterstreifen im geschlossenen Folienbeutel auf Raumtemperatur bringen. Die nicht benötigten Mikrotiterstreifen dem Halterahmen entnehmen, wieder in den Beutel legen (das Trockenmittel im Beutel belassen) und diesen **sorgfältig** verschließen.

Für die Bearbeitung von neuen Testkits sollte immer ein Halterahmen aufbewahrt werden, in den dann die jeweils benötigten Mikrotiterstreifen gesetzt werden können.

5.3 Probenverdünnungspuffer

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen.

Der fertige Probenverdünnungspuffer muß bei 2 - 8 °C gelagert werden und ist dann mindestens 2 Monate haltbar.

5.4 Waschpuffer

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.

Der fertige Waschpuffer muß bei 2 - 8 °C gelagert werden und ist dann mindestens 2 Monate haltbar.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6. Testdurchführung

6.1 Proben-Inkubation

Jeweils 100 µl Probenverdünnungspuffer (als Leerwert oder als Nullstandard), je 100 µl der Standards (S1 bis S6), der Positiven Kontrolle und 100 µl der verdünnten Proben (vorzugsweise als Doppelbestimmungen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren. Streifen 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

6.2 Waschen

Vertiefungen entleeren, mit ca. 250 µl Waschpuffer füllen, und wieder entleeren. Diesen Vorgang insgesamt 3 - 4 mal durchführen. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

6.3 Konjugat-Inkubation

Jeweils 100 µl Enzymkonjugat in die Vertiefungen füllen. Streifen 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

6.4 Waschen

Wie unter Punkt 6.2 beschrieben.

6.5 Substrat-Inkubation

Jeweils 100 µl Substrat in die Vertiefungen füllen und 5 - 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.

6.6 Stoppen der Substratinkubation

Jeweils 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen füllen; dabei die gleiche Reihenfolge und den gleichen Zeittakt einhalten wie bei Zugabe der Substratlösung.

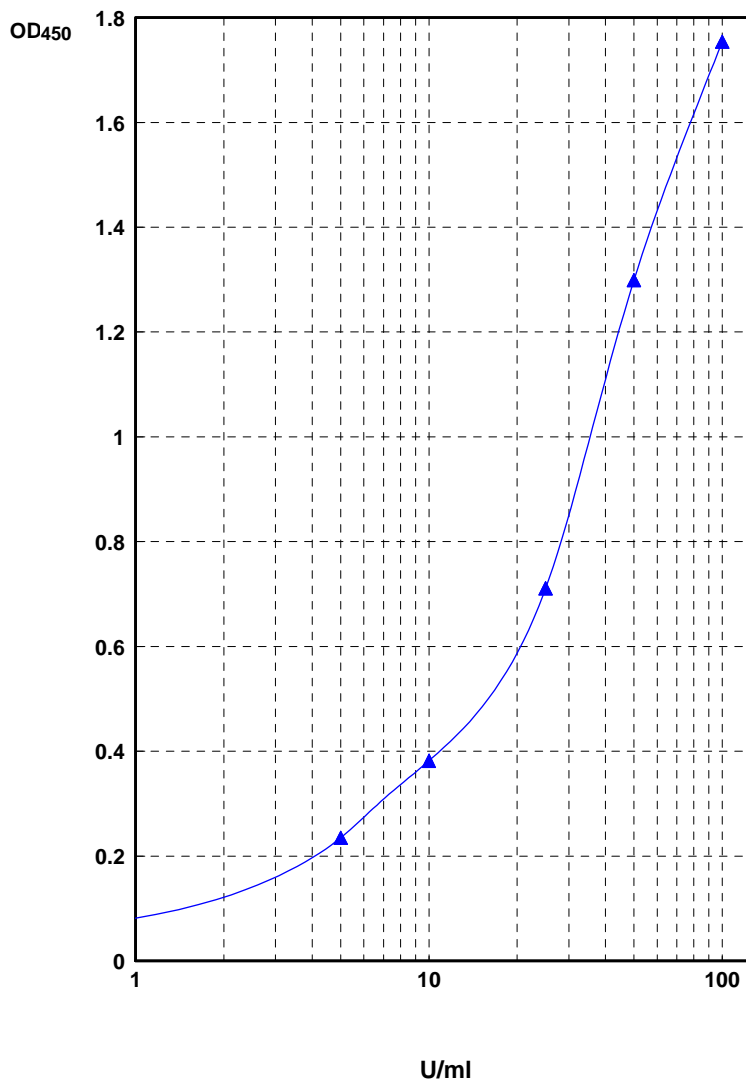
6.7 Messung

Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Meßwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) gegen Luft messen. Die Messung sollte innerhalb von 10 Minuten, spätestens innerhalb 1 Stunde nach dem Abstoppen erfolgen.

7. Auswertung

Für die Erstellung der Standardkurve werden die OD-Werte der Standards (linear) gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Die Konzentrationen der BPI-Autoantikörper in U/ml des unverdünnten Patientenserum können dann direkt aus der Eichkurve abgelesen werden. Die im Test verwendete 1:51-Verdünnung wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards berücksichtigt.

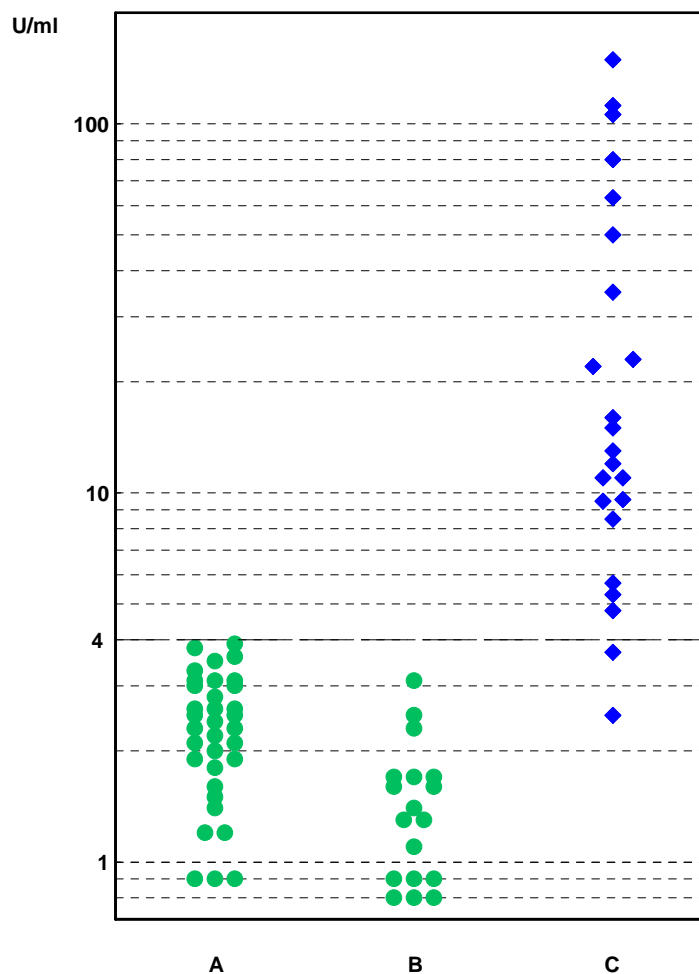
Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



8. Interpretation der Ergebnisse

Referenzbereiche für Antikörper gegen das BPI-Protein müssen noch ermittelt werden. Die im anti-BPI-IgG ELISA gefundenen Werte von Patientenproben wurden mit den von der Arbeitsgruppe Zhao/Lockwood, Universität Cambridge, ermittelten Werten verglichen. Zusätzlich wurde im anti-BPI-IgG ELISA ein Normalkollektiv getestet. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

Aus diesen Daten kann ein vorläufiger Cut-off Wert von ca. 4 U/ml angenommen werden.



A Normalseren (n=34)

B Patientenseren, die mit dem Test nach (1) negativ gefunden wurden (n=18)

C Patientenseren, die mit dem Test nach (1) positiv gefunden wurden (n=23)

(1) M.H. Zhao, S.J. Jones, C.M. Lockwood

Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies (ANCA) in vasculitis

Clin. Exp. Immunol. 99 (1995) 49-56

9. Literatur

- M.H. Zhao, S.J. Jones, C.M. Lockwood
Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies (ANCA) in vasculitis
Clin. Exp. Immunol. 99 (1995) 49-56
- M.H. Zhao, D.R.W. Jayne, L.G. Ardiles, F. Culley, ME. Hodson, C.M. Lockwood
Autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in patients with cystic fibrosis
Q J Med 89 (1996) 259-265
- M.P. Stoffel, E. Csernok, C. Herzberg, T. Johnston, SF. Carroll, W.L. Gross
Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against bactericidal/permeability-increasing protein (BPI): a new seromarker for inflammatory bowel disease and associated disorders
Clin. Exp. Immunol. 104 (1996) 54-59

Abstracts vom 7. International ANCA Workshop, Mayo Clinic, Rochester, USA, 1996
in: Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases 13 (1996) 205-284

D.S. Bansi, B.J. Cameron, M. Zhao, F. McWilliams, G. Scholey, B. Ferry,
H. Chappel, K.A. Fleming, M. Lockwood, R.W. Chapman

Antigen specificity of antineutrophil antibodies in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis and autoimmune hepatitis

A. Šedivá, J. Bartunková, I. Kolarová, V. Vávrová

ANCA with the specificity for bactericidal/permeability increasing protein in children with cystic fibrosis

R.S. Walmsley, M.H. Zhao, M.I. Hamilton, A. Brownlee, P. Chapman,
R.E. Pounder, A.J. Wakefield, C.M. Lockwood

Clinical relevance of anti bactericidal/permeability increasing protein antibodies in inflammatory bowel disease

C. Roozendaal, G. Horst, E.B. Haagsma, C. Schwartz, H.H. Peter, P. Berg,
J.W. Cohen Tervaert, P.C. Limburg, C.G.M. Kallenberg

Bactericidal/permeability-increasing protein is a major antigen in primary sclerosing cholangitis

R.S. Walmsley, M.H. Zhao, M.I. Hamilton, A. Brownlee, P. Chapman,
A.P. Dhillon, R. Dick, J.S. Dooley, R.E. Pounder, A.J. Wakefield, C.M. Lockwood

Clinical relevance of anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies and anti bactericidal/permeability-increasing protein autoantibodies in primary sclerosing cholangitis

C.E.H. Siegert, J.W. Cohen Tervaert, E. Heemskerk, C.G.M. Kallenberg,
L.A. van Es, D.R. Daha

Occurrence of antibodies to bactericidal/permeability-increasing protein in sera with perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) activity

H. Schultz, E. Csernok, A. Schuster, M. Ernst, W.L. Gross
Importance of BPI-ANCA in patients with cystic fibrosis

Pipettierschema

Standards S1 - S6	100 µl
Positive Kontrolle	100 µl
Patientenproben 1:51 verdünnt	100 µl



60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur



3 - 4 x Waschen



Enzymkonjugat	100 µl
---------------	--------



30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur



3 - 4 x Waschen



Substrat	100 µl
----------	--------



5 - 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur



Stopplösung	100 µl
-------------	--------



Messung der Extinktion bei 450 nm