



Arbeitsanleitung


anti - GBM - ELISA

**Enzymimmunoassay für die quantitative
Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen das
NC1 α 3(IV) Antigen der glomerulären Basalmembran
in Serum und Plasma**



REF EA507/48 EA506/96

 6 x 8 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

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
Pipettierschema	Seite	10

1. Klinische Bedeutung und Testprinzip

Autoantikörper gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM) verursachen dort über eine lokale Komplementaktivierung eine Entzündungsreaktion und damit letztendlich eine weitgehende Zerstörung der Nieren. Bei einer Nierenbiopsie lassen sich Immunglobulindepots an der glomerulären Basalmembran nachweisen. Das Auftreten von anti-GBM-Antikörper im Serum läßt auf das Vorliegen eines Goodpasture Syndroms schließen. Eine Transplantation ist bei solchen Patienten von geringem Heilungserfolg. Daher ist es wichtig, eine durch ANCA verursachte Glomerulonephritis vom Goodpasture Syndrom zu unterscheiden, da sich die entsprechenden Therapien wesentlich unterscheiden. Bei entsprechendem Verdacht sollte daher sowohl auf anti-MPO-Antikörper als auch auf anti-GBM-Antikörper getestet werden.

Der anti-GBM-ELISA ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay. Während der Probeninkubation binden anti-GBM-Antikörper aus den verdünnten Patientenproben und Standards an hochreines GBM-Antigen, das auf der Oberfläche von Mikrotiter-Vertiefungen immobilisiert ist. Als GBM-Antigen wird die NC1-Domäne der alpha 3(IV)-Kette des Typ IV Kollagens eingesetzt.

Nach einem Waschschrift wird Peroxidase-markiertes anti-human IgG zugesetzt, das an die GBM-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. gegen 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 | STRIPS | 6 (12) Stück |
| | Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar
beschichtet mit hochreinem NC1 alpha 3(IV) Antigen | | |
| 4.2 | Enzymkonjugat | CONJ | 1 Fläschchen |
| | 12 ml, gebrauchsfertig
Anti-human IgG vom Kaninchen
konjugiert an Peroxidase, rot eingefärbt | | |

- 4.3 **Standards** **CAL S1** – **CAL S6** 6 Fläschchen
je 1.0 ml (2 ml), gebrauchsfertig
enthalten GBM-Antikörper in Humanserum

Konzentrationen:

Standard	S1	S2	S3	S4	S5	S6
U/ml	2,5	5,0	10	25	50	100

- 4.4 **Positiv-Kontrolle** **CON +** 1 Fläschchen
1.0 ml (2 ml), Humanserum, gebrauchsfertig
Konzentration siehe Q.C.-Zertifikat

- 4.5 **Probenverdünnungspuffer** **DIL** 1 Fläschchen
15 ml, Konzentrat (15x), blau eingefärbt

- 4.6 **Waschpuffer** **WASH** 1 Fläschchen
75 ml, Konzentrat
Inhalt mit bidest. Wasser auf 1 Liter auffüllen.

- 4.7 **Substrat** **SUB** 1 Fläschchen
12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig

- 4.8 **Stopplösung** **STOP** 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 (20 µl Probe + 1 ml Puffer). Verdünnte Proben, die für eine eventuelle Wiederholungsmessung aufbewahrt werden sollen, müssen ebenfalls eingefroren werden.

5.2 Mikrotiterstreifen **STRIPS**

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 **DIL**

Benötigte Menge des Konzentrates mit destilliertem Wasser 1+14 verdünnen (z. B. 5 ml Konzentrat + 70 ml dest. Wasser).

Der fertige Probenverdünnungspuffer muß bei 2 - 8 °C gelagert werden und ist dann 1 Woche haltbar.

5.4 Waschpuffer **WASH**

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.

5.5 Standards und Kontrollen

Die Standards und die Kontrolle sind gebrauchsfertig. Der Probenverdünnungspuffer dient als Nullstandard.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6. Testdurchführung

6.1 Proben-Inkubation

Jeweils 100 µl Probenverdünnungspuffer (Nullstandard), 100 µl der Standards (S1 bis S6) und die positive Kontrolle sowie 100 µl der verdünnten Proben (vorzugsweise als Doppelbestimmungen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren und 30 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 und 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.

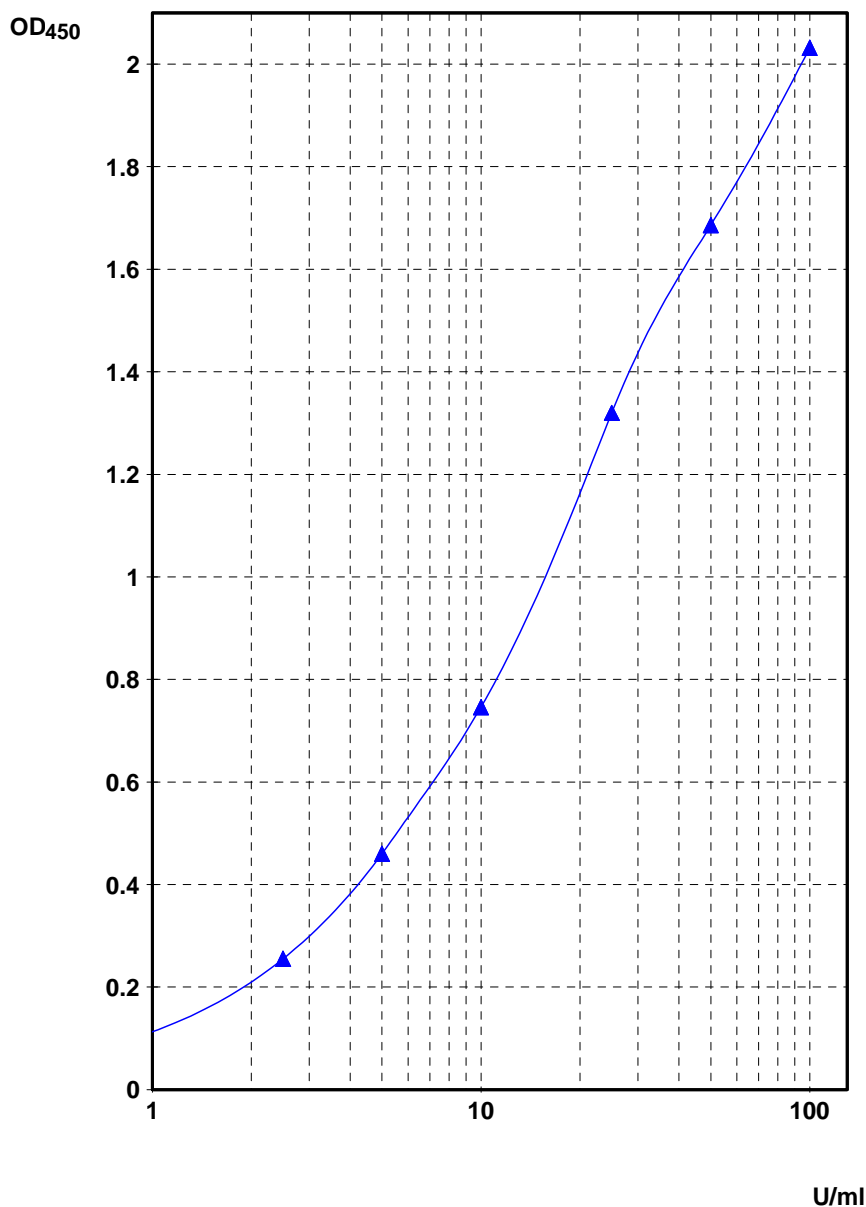
Die Messung sollte möglichst innerhalb von 10 Minuten, spätestens innerhalb 1 Stunde nach dem Abstoppen erfolgen.

7. Auswertung

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

Die optische Dichte des Nullstandards (Blank) sollte kleiner als 0,25 sein.

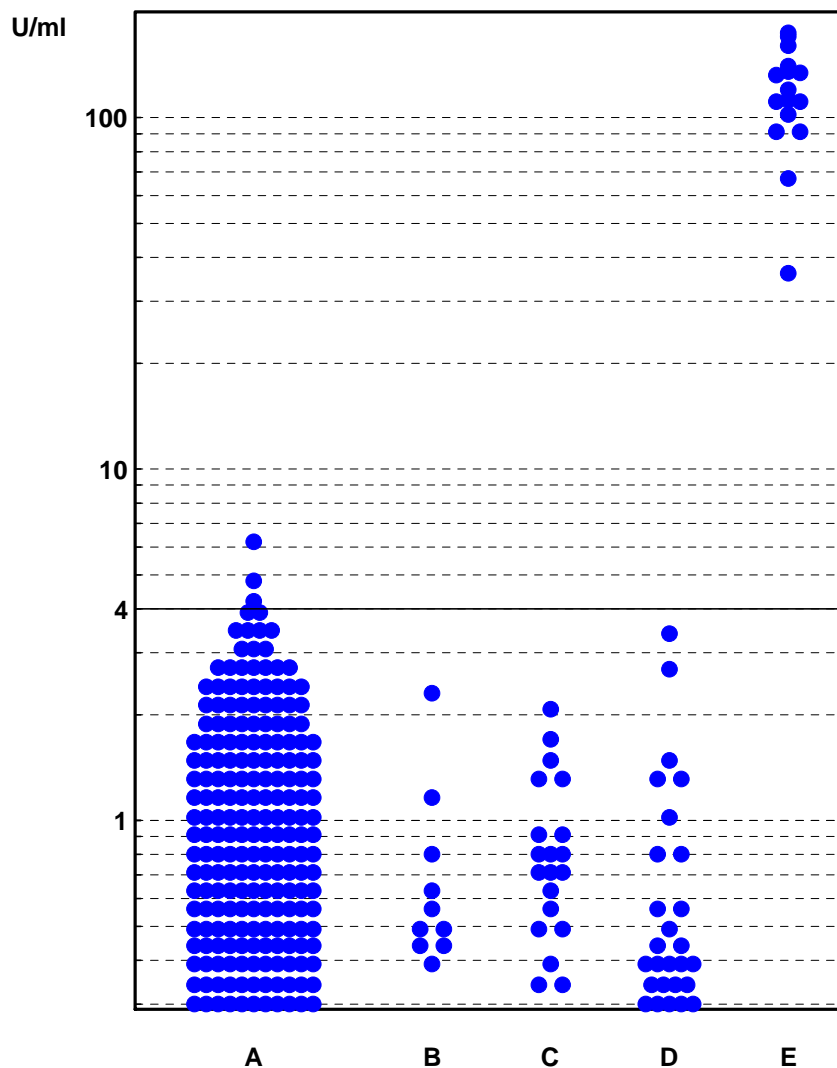
Die nachfolgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



8. Interpretation der Ergebnisse

Ein Normalkollektiv aus 212 gesunden Blutspendern wurde im anti-GBM ELISA gemessen. Der Median lag bei 0,9 U/ml; 98 Prozent der Seren lagen unterhalb von 4,0 U/ml. Als weitere Kontrollkollektive wurden Seren von Patienten mit SLE, Rheumatoider Arthritis und Vaskulitis (ANCA-positiv) getestet. Keines dieser Seren lag oberhalb von 4,0 U/ml. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

Aus diesen Daten kann ein Referenzbereich von $< 4,0$ U/ml angenommen werden.



- A Normalseren (n = 212)
- B SLE (n = 10)
- C Rheumatoide Arthritis (n = 20)
- D Vaskulitis (n = 27)
- E Goodpasture Syndrom (n = 16)

Pipettierschema

Probenverdünnungspuffer (Nullstandard)	100 µl
Standards S1 - S6	100 µl
Positiv-Kontrolle	100 µl
Patientenprobe 1:51 verdünnt	100 µl



30 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