



Arbeitsanleitung


Gliadin - IgA - ELISA


Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
IgA-Antikörpern gegen Gliadin
in Serum und Plasma

CE

IVD

REF EA510/96

 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 (quantitativer Test)	Seite	8
8. Referenzbereich	Seite	9
9. Screening-Test (qualitativer Test)	Seite	10
10. Sensitivität und Spezifität	Seite	10
11. Reproduzierbarkeit	Seite	10
12. Literatur	Seite	11
Pipettierschema	Seite	12

1. Klinische Bedeutung und Testprinzip

Gliadin ist eine Gruppe von alkohollöslichen Proteinen, die Glutamin enthalten und Bestandteil des in Getreide enthaltenen Glutens sind. Sie können beim Menschen Zöliakie und glutensensitive Enteropathie auslösen. Histologisch ist die Erkrankung durch charakteristische Veränderungen in der Dünndarm-Mukosa nachweisbar. Durch eine konsequent glutenfreie Diät können die Krankheitssymptome behandelt werden. Die Symptome treten nach erneuter Gluten-Zufuhr wieder auf. Die Messung von Antikörpern gegen Gliadin in Serum oder Plasma ermöglicht die Diagnose und Verlaufskontrolle der Zöliakie, der Dermatitis herpetiformis, sowie die Überwachung glutenfreier Diäten. Die Bestimmung mittels nichtinvasiver Methoden wie ELISA reduziert die Anzahl der notwendigen Dünndarm-Biopsien auf ein Minimum.

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

Nach einem Waschschrift wird Peroxidase-markiertes anti-human IgA zugesetzt, das an die Gliadin-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 Mikrotiter-plattenphotometer bei 450 nm gemessen und mit Hilfe der im Test eingesetzten Standardreihe in Konzentrationen umgerechnet.

Der Assay kann auch als Screeningtest verwendet werden, indem man nur die Negativ-Kontrolle und die Cut-off Kontrolle (4 U/ml) einsetzt. Bei Patientenproben, deren O.D. größer oder gleich der O.D. der Cut-off Kontrolle ist, sollte eine Quantifizierung der Gliadin Antikörper erfolgen.

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 mit hierfür zugelassenen Tests 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 3 Monate stabil (bzw. bis zum Verfallsdatum, wenn dies kürzer als 3 Monate ist). Zur Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien siehe Punkt 5. auf Seite 6.

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 | 12 Stück |
| | Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar
beschichtet mit hochreinem Gliadin | | |
| 4.2 | Enzymkonjugat | CONJ | 1 Fläschchen |
| | 12 ml, gebrauchsfertig
Anti-human IgA vom Kaninchen
konjugiert an Peroxidase, gelb eingefärbt | | |

- 4.3 **Standards** **CAL S1** – **CAL S2** 6 Fläschchen
 Je 1 ml verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig

Konzentrationen:

Standard	S1	S2	S3	S4	S5	S6
U/ml	0	6,25	12,5	25	50	100

- 4.4 **Positive Kontrolle** **CON +** 1 Fläschchen
 1 ml verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig
- 4.5 **Negative Kontrolle** **CON -** 1 Fläschchen
 1 ml verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig
- 4.6 **Cut-off Kontrolle** **CON +/-** 1 Fläschchen
 1 ml verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig
 Konzentration: **4 U/ml**
- 4.7 **Probenverdünnungspuffer** **DIL** 1 Fläschchen
 15 ml, Konzentrat, blau eingefärbt
- 4.8 **Waschpuffer** **WASH** 1 Fläschchen
 75 ml, Konzentrat
 Inhalt mit bidest. Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- 4.9 **Substrat** **SUB** 1 Fläschchen
 12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig
- 4.10 **Stopplösung** **STOP** 1 Fläschchen
 12 ml, gebrauchsfertig
 Enthält 0,08M Schwefelsäure
 Vorsicht, ätzend!

Zusätzlich benötigte Materialien und nützliche Hilfsmittel

- Variable Präzisionspipetten mit auswechselbaren Spitzen (10 µl, 100 µl, 1 ml)
- 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 sollten für eine längere Aufbewahrung bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren soll vermieden werden. Hämolytische Proben sollten nicht verwendet werden.

Die Patientenproben müssen für die Messung 1:101 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt werden (z.B.:10 µl Probe + 1 ml Puffer).

5.2 MT-Streifen **STRIPS**

Mikrotiterstreifen im geschlossenen Folienbeutel in etwa 10 Minuten 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 gebrauchsfertige Waschpuffer muß bei 2 - 8 °C gelagert werden und ist dann 3 Monate haltbar.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6. Testdurchführung

6.1 Proben-Inkubation

Jeweils 100 µl Standards (S1 bis S6), Kontrollen und 100 µl der verdünnten Proben (vorzugsweise als Doppelbestimmungen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren. Streifen mit Klebefolie abdecken 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. Streifen abgedeckt 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.

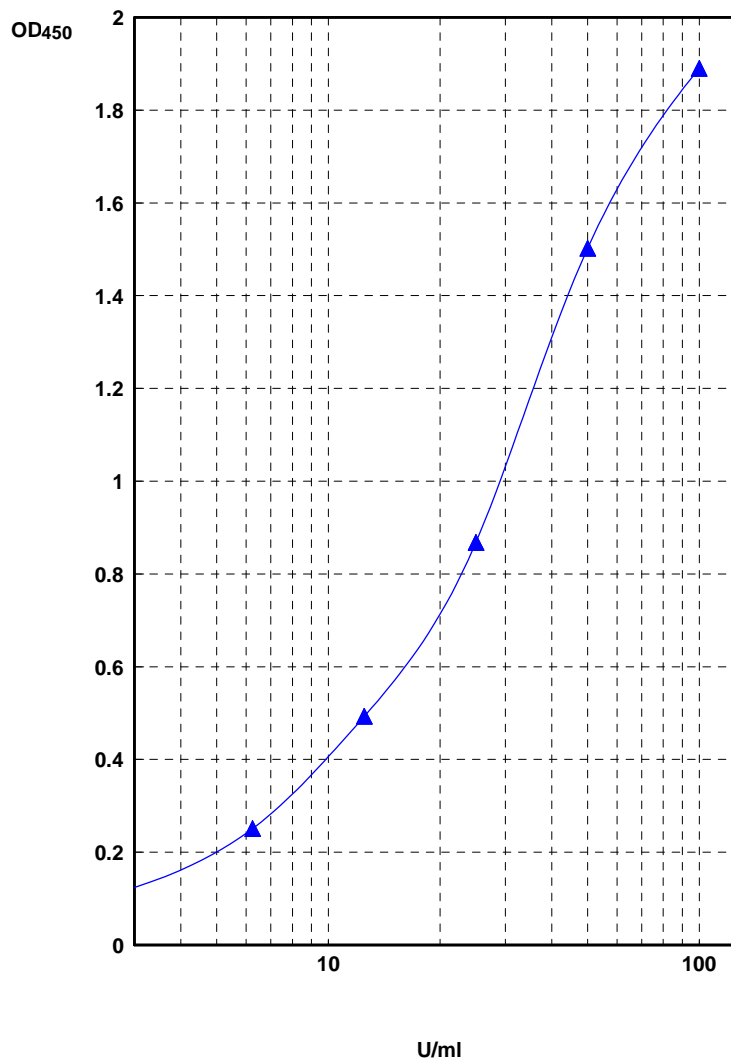
6.7 Messung

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 erfolgen.

7. Auswertung (Quantitativer Test)

Für die Erstellung der Standardkurve werden die O.D.-Werte der Standards (linear) gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Die Konzentrationen der Gliadin-Antikörper in U/ml des unverdünnten Patientenserum können dann direkt aus der Eichkurve abgelesen werden. Die im Test verwendete 1:101-Verdünnung wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards berücksichtigt.

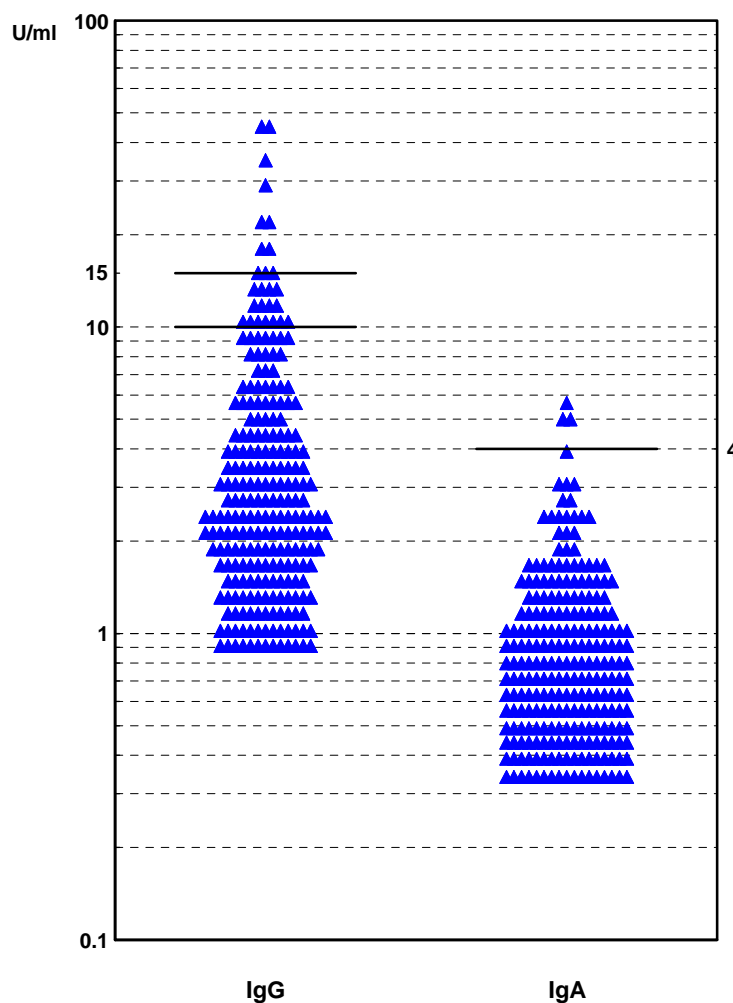
Typische Standardkurve (Beispiel)



8. Referenzbereich

Zur Ermittlung der Referenzbereiche wurden Seren von 240 gesunden Personen im Gliadin-IgA-ELISA und Gliadin-IgG-ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

Danach können Seren mit einer Gliadin-IgA Konzentration von über 4 U/ml als positiv betrachtet werden. Der angegebene Referenzbereich gilt jedoch lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, daß jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich erstellt.



9. Screening-Test (qualitativer Test)

Der Gliadin-IgA-ELISA kann auch als Screening-Test eingesetzt werden. Dazu werden anstelle der sechs Standards nur die Cut-off Kontrolle (4 U/ml) und die Negativ-Kontrolle mit den Patientenproben eingesetzt. In der Auswertung werden dann die O.D.-Werte der Patientenproben mit den O.D.-Werten der Cut-off Kontrolle (Grenzwert) verglichen.

Proben, deren O.D. kleiner als die O.D. der Cut-off Kontrolle ist, sind als negativ zu betrachten.

Proben, deren O.D. größer oder gleich der O.D. der Cut-off Kontrolle ist, sind als positiv zu bewerten und sollten im quantitativen Testverfahren bestimmt werden.

Die O.D. der Negativ-Kontrolle sollte unter dem O.D.-Wert der Cut-off Kontrolle liegen und kleiner als 0,5 sein (laborinterne Qualitätskontrolle). Liegt die O.D. der Negativ-Kontrolle über 0,5 sollten die Testergebnisse verworfen und der Test neu angesetzt werden.

10. Sensitivität und Spezifität

Zur Messung der Sensitivität und Spezifität wurden 53 Proben von Patienten mit nachgewiesener Zöliakie, 35 Patienten mit behandelter Zöliakie und Dermatitis herpetiformis, 90 Kontrollpatienten ohne Zöliakie sowie 194 erwachsenen Blutspendern im Assay eingesetzt.

Gliadin-IgA	Zöliakie nachgew.	Zöliakie negativ
positiv	34	13
negativ	19	306

Daraus ergeben sich eine Sensitivität von 64,2% und eine Spezifität von 95,9%.

11. Reproduzierbarkeit

Die intra- und inter-Assay-Variationskoeffizienten wurden mit 2 Proben unterschiedlicher Konzentration (Angaben in U/ml) ermittelt.

intra-Assay Variation (n=10)		
Probe	MW	VK (%)
1	135	4
2	3	3

inter-Assay-Variation (n=3)		
Probe	MW	VK (%)
1	140	7
2	3	8

12. Literatur

1. *M.Maki et al.*
Changing pattern of childhood celiac disease in Finland
Acta Paediatr. Scand. 77; 408 - 412 (1988)
2. *S. Guandalini et al.*
Diagnosis of celiac disease: Time for a change?
Arch Dis Child 64; 1320 - 1325 (1989)
3. *L. Greco et al.*
Multi-centre study on the frequency of identified cases of celiac disease in Europe and in the Mediterranean area.
ESPGAN, Capri, 11 - 12 October 1991
4. *M. Ceccarelli et al.*
Is childhood celiac disease under-diagnosed?
Eur J Paediatrics 150; 821 - 822 (1991)
5. *A. Lerner, V. Kumar, TC. Iancu*
Immunological Diagnosis of Childhood Coeliac Disease; Comparison between antigliadin, antireticulin and antiendomysial antibodies.
Clin Exp Immunol 95; 78 - 82 (1994)
6. *E. Grodzinsky, G. Jansson, T. Skogh, L. Stenhammar, K. Falth-Magnusson*
Anti-endomysium and anti-gliadin antibodies as serological markers for coeliac disease in childhood: a clinical study to develop a practical routine.
Acta Paediatr 84(3); 294 - 298 (1995)
7. *JM. Littlewood*
Coeliac disease in childhood
Baillieres Clin Gastroenterol 9(2); 295 - 327 (1995)
8. *GR. Corazza, G. Gasbarrini*
Coeliac disease in adults
Baillieres Clin Gastroenterol 9(2); 329 - 350 (1995)

Pipettierschema

Standards S1 - S6	100 µl
Kontrollen	100 µl
Patientenprobe 1 : 101 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