

ELISA

zur Bestimmung von
Autoantikörpern (IgA) gegen

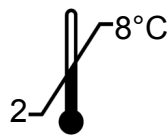
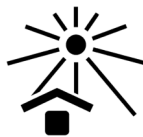
humane rekombinante
epidermale Transglutaminase (eTG)

Gebrauchsinformation

REF 2912FE00.FWD  12 x 8 Bestimmungen

IVD

CE



STEFFENS BIOTECHNISCHE ANALYSEN GmbH

Gewerbestr. 7

D-79285 Ebringen (FRG)

Tel./Fax: +49 7664 60025-4 / -5

Email: info@steffens-biotec.com

Inhalt

1. Einführung und Hintergrund
2. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen
3. Testprinzip
4. Inhalt des Testkits
5. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien
6. Aufbewahrung des Testkits
7. Reagenzien- und Probenvorbereitung / Anforderungen an die Proben
8. Durchführung des Tests
 - 8.1. Manuelle Durchführung
 - 8.2. Dynex DS2 automatisches ELISA System
9. Auswertung und Qualitätskontrolle
10. Interpretation der Ergebnisse / Grenzen der Methode
11. Testcharakteristika
 - 11.1. Standardisierung
 - 11.2. Analytische Spezifität
 - 11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)
 - 11.4. Homogenität der Festphase
 - 11.5. Linearität
 - 11.6. Präzision
 - 11.7. Häufigkeitsverteilung von eTG IgA
 - 11.8. Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System
12. Garantie und Haftung
13. Symbole
14. Literatur
15. Kurzanleitung

Das hier beschriebene Produkt entspricht den Anforderungen der IVD-Direktive 98/79/EG.

Dokument Id.-No. / Version: 2912FE30.FWD.doc / 2019-08-07

1. Einführung und Hintergrund

Bei bestimmten Individuen geht die Zöliakie (celiac disease, CD) einher mit der Hautkrankheit Dermatitis herpetiformis Dühring (DH). Offenbar haben beide Krankheiten eine gemeinsame Ätiologie (1).

CD greift den oberen Dünndarm an, bedingt durch eine Überempfindlichkeits-Reaktion auf eingenommenes Gluten. Gluten umfasst eine Reihe von Proteinen, die in vielen Getreidekörnern vorkommen, etwa in Weizen, Hafer, Gerste und Roggen. Die morphologische Manifestation der CD, eine mehr oder weniger vollständige Zottenatrophie der Schleimhaut, führt zu Absorptionsproblemen, bspw. zu chronischem Vitaminmangel (2).

Auch DH beruht auf Gluten-Überempfindlichkeit. Symptome sind polymorphe Knötchen und Blasen, besonders auf der äußeren Oberfläche der größeren Gelenke (3, 4). Charakteristisch für DH sind auch granuläre IgA-Ablagerungen in der papillären Dermis (5).

Man weiß seit langem, daß Zöliakie-Patienten einen erhöhten Titer an Gluten-spezifischen Antikörpern aufweisen. Außerdem sind IgA-Autoantikörper gegen das Endomysium der glatten Muskulatur spezifisch mit dieser Krankheit assoziiert. Die Gewebstransglutaminase (tissue transglutaminase, tTG) wurde identifiziert als das vorherrschende endomysiale CD-Autoantigen (6). Dagegen ist offenbar die epidermale Transglutaminase (eTG; Synonym: Typ 3-TG) das eigentliche Autoantigen der DH (7). Tatsächlich scheinen IgA-Autoantikörper gegen eTG ein noch empfindlicherer DH-Marker zu sein als tTG-Antikörper (8, 9, 10).

Der vorliegende Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ist dazu bestimmt, IgA-Antikörper in menschlichem Serum oder Plasma (vgl. Abschnitt 7) quantitativ oder qualitativ zu messen, die gegen eTG gerichtet sind. Das immobilisierte Antigen ist ein hochgereinigtes, rekombinantes Präparat menschlicher eTG. Der Test ist schnell (Inkubationszeit 30 / 30 / 30 Minuten) und flexibel (teilbare Festphase, gebrauchsfertige Reagenzien). 6 Standards erlauben quantitative Messungen; eine negative und eine positive Kontrolle prüfen die Funktion des Testansatzes.

2. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der Test ist ausschließlich für die in vitro-Diagnostik bestimmt; nicht für die interne oder externe Anwendung an Menschen oder Tieren. Er darf nur von geschultem Personal eingesetzt werden.

Die Reagenzien nicht über ihr Verfallsdatum hinaus verwenden. Es wird nachdrücklich empfohlen, das Protokoll genau einzuhalten.

Als antimikrobielles Reagenz enthalten Probenpuffer, Standards und Kontrollen Na-Azid; der Waschpuffer Bromonitrodioxan und das Konjugat Methylisothiazolon / Bromonitrodioxan. Das Substrat enthält 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Die Stopplösung, 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄), ist sauer und ätzend.

Diese Reagenzien sind giftig, wenn sie aufgenommen werden. Daher müssen die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung gefährlicher Chemikalien getroffen werden. Jeden Körperkontakt vermeiden, Handschuhe und Schutzbrille tragen. Sollte dennoch Haut (oder Schleimhaut) von einem Reagenz benetzt werden, die betroffene Stelle sofort mit viel Wasser abspülen. Nicht mit dem Mund pipettieren. Die Reagenzien gemäß lokalen / nationalen Vorschriften entsorgen.

Na-Azid kann mit Kupfer- und Bleirohren reagieren und explosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit Wasser nachspülen, um eine Akkumulation zu verhindern.

Die Standards und Kontrollen enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Sie wurden daraufhin geprüft, ob Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Ag, Hepatitis B-Oberflächen (HBs)-Ag und Antikörper gegen HIV 1/2 und Hepatitis C-Virus (HCV) vorliegen und zeigten negative Resultate; entweder in einem FDA-zugelassenen oder einem CE-konformen Test, entsprechend der Europäischen Richtlinie 98/79/EC.

Allerdings kann kein Test garantieren, dass Material humanen Ursprungs tatsächlich nicht infektiös ist. Die Präparate sollten daher als potenziell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, ebenso wie die Proben (und Reste von ihnen); gemäß CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA)- oder anderen lokalen / nationalen Richtlinien zu Laborsicherheit und Dekontaminierung.

3. Testprinzip

Die Kavitäten der Festphase sind beschichtet mit eTG. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion: eTG-Antikörper aus der Probe binden an das immobilisierte Antigen; es bildet sich der Antigen-Antikörper-Komplex. Nicht-gebundene Probenbestandteile werden anschließend von der Festphase gewaschen.
2. Reaktion: Ein zweiter, gegen human-IgA gerichteter und mit Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper wird zugesetzt. Dieses Konjugat bindet seinerseits an den Antigen-Antikörper-Komplex. Überschüssiges Konjugat wird anschließend von der Festphase gewaschen.
3. Reaktion: Der Enzym-markierte Komplex setzt ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt um. Das Ausmaß der Farbentwicklung spiegelt die Menge an IgA-Antikörpern gegen eTG in der Probe wider.

4. Inhalt des Testkits

- a. 1 Mikrowell-Platte, beschichtet mit eTG und hermetisch in einem Beutel aus laminiertes Metallfolie verpackt, zusammen mit Trockenmittel. Die Platte besteht aus 12 Streifen, die sich jeweils in 8 Einzelkavitäten teilen lassen.

MWP	12x8
------------	-------------

- b. Probenpuffer, 100 mL, gebrauchsfertig, orange gefärbt. Enthält Tris-gepufferte Saline (TBS), bovines Serumalbumin (BSA), Tween und Na-Azid.

BUF	SPL
------------	------------

- c. Waschpuffer, 100 mL, 10x-Konzentrat, blau gefärbt. Enthält TBS, Tween und Bromonitrodioxan.

BUF	WASH	10x
------------	-------------	------------

- d. 6 Standards à 2,0 mL, 0 - 2,0 - 5,0 - 12 - 30 und 70 U eTG IgA / mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau gefärbt. Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.

CAL	1-6
------------	------------

- e. Negative und positive Kontrolle, je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot gefärbt. Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.

CONTROL	-	CONTROL	+
----------------	----------	----------------	----------

- f. Anti-human IgA HRP-Konjugat, 14 mL, gebrauchsfertig, gelb gefärbt. Gepufferte Lösung mit stabilisierendem Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan.

CONJ	IgA
-------------	------------

- g. Substrat, 14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Enthält eine gepufferte Lösung von TMB und H₂O₂, abgefüllt in einem Licht-undurchlässigen Gefäß.

SUBS	TMB
-------------	------------

- h. Stopplösung (0,2 M H₂SO₄), 14 mL, farblos, gebrauchsfertig. Vorsicht: Schwefelsäure ist ätzend.

SOLN	STOP
-------------	-------------

- i. Gebrauchsinformation
- j. Chargen-spezifisches Analysen-Zertifikat

5. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien

- a. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- b. Messzylinder, 1000 mL
- c. Reagenzröhrchen für die Probenverdünnung (Transfer-Röhrchen im Mikrowell-Plattenformat empfohlen)
- d. Pipetten für 10, 100 und 1000 µL (1- und 8-Kanalpipetten empfohlen)
- e. Mikrowell-Plattenwascher (optional)
- f. Mikrowell-Plattenphotometer mit 450 nm-Filter
- g. ELISA Auswertungsprogramm (empfohlen)

6. Aufbewahrung des Testkits

Der Testkit muss bei 2 - 8°C gelagert werden. Er ist bis zum Verfallsdatum einsetzbar, das auf dem Etikett der Verpackung angegeben ist; danach nicht mehr verwenden.

7. Reagenzien- und Probenvorbereitung / Anforderungen an die Proben

Wegen möglicherweise unterschiedlichen Lagerungs- und Transport-Bedingungen dürfen korrespondierende Komponenten aus verschiedenen Kits nicht vermischt oder gegeneinander ausgetauscht werden. Wird der Kit in mehreren Portionen verwendet, sollten nur die für den aktuellen Test benötigten Volumina den verschiedenen Fläschchen entnommen werden. Dabei ist **ganz wichtig**, dass es zu keinerlei Kreuzkontamination zwischen den Reagenzien kommt! Nur saubere Pipetten verwenden; Reagenzienreste **nicht** in die Original-Fläschchen zurückgeben.

- a. Den Beutel mit der Festphase akklimatisieren lassen, erst dann öffnen. Die für den aktuellen Test evtl. nicht benötigten Kavitäten sofort aus dem Gitterrahmen nehmen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Folienbeutel zurücklegen.

Diesen hermetisch verschließen und bis zur künftigen Verwendung weiter gekühlt lagern.

- b. Das Waschpuffer-10x-Konzentrat (100 mL, blau) wird mit 900 mL deionisiertem Wasser verdünnt und gut durchmischt. Gekühlt bei 2 - 8°C ist diese Lösung für mehrere Wochen stabil.
- c. Präparation der Proben: Patientenserum als potenziell infektiös betrachten und entsprechend vorsichtig handhaben. Neben Serum ist auch EDTA-, Citrat- oder Heparin-behandeltes Plasma als Probenmaterial geeignet.

Anforderungen an die Proben: Stark lipämische oder hämolysierte Proben sowie mikrobiell verunreinigte Seren können falsche Ergebnisse liefern und sollten daher vermieden werden.

Die Proben mit üblicher Labortechnik präparieren. Trübe Proben müssen zunächst geklärt (zentrifugiert) werden. Die klaren oder geklärten Proben werden mit dem Probenpuffer 1:100 in Reagenzröhrchen verdünnt; bspw. 10 µL Serum + 990 µL Probenpuffer. Die Verdünnungen gut durchmischen.

Zum schnellen Dispensieren während des Testablaufs empfiehlt es sich, Standards, Kontrollen und Proben in Transferröhrchen (Microwell-Format) vorzulegen. Dann kann mit einer 8-Kanal-Pipette gearbeitet werden.

Proben, die nicht sofort analysiert werden können, müssen bei 2 - 8°C gelagert und innerhalb von 3 Tagen gemessen werden. Ist eine längere Lagerung vorgesehen, so müssen sie eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Aufgetaute Proben vor dem Verdünnen durchmischen.

8. Durchführung des Tests

8.1. Manuelle Durchführung

Bevor der Test gestartet wird, müssen alle Kitkomponenten Raumtemperatur (23 ± 3°C) angenommen haben.

Um das bestmögliche Ergebnis (d.h. ein maximales Verhältnis zwischen spezifischem und Hintergrund-Signal) zu erreichen, ist **sorgfältiges Waschen** ganz wesentlich (Schritte a, c und e). Insbesondere ist es wichtig, die **Waschlösung vollständig aus den Kavitäten zu entfernen**. Dazu klopft man die Festphase auf Saugpapier aus. Automatische Wascher müssen daraufhin geprüft werden, ob ihre Ergebnisse mit denen vergleichbar sind, die mit manuellem Waschen erzielt werden.

- a. Unmittelbar vor Testbeginn die Kavitäten einmal mit je 350 µL Waschpuffer füllen, ca. 10 Sekunden einwirken lassen und wieder entleeren.

b. Je 100 µL der Standards (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau), der Kontrollen (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün und rot) und der verdünnten Proben zügig in die Kavitäten pipettieren. Doppelbestimmungen werden empfohlen.

Die Kavitätenplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) inkubieren.

c. Die Kavitäten 4x wie in Schritt a waschen.

d. Je 100 µL Konjugat (14 mL, gebrauchsfertig, gelb) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b.

e. Waschschritt c wiederholen.

f. Je 100 µL Substrat (14 mL, gebrauchsfertig, farblos, im schwarzen Gefäß) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b. Das Substrat ist lichtempfindlich; direkte Belichtung (bspw. Sonnenlicht) während der Inkubation vermeiden.

g. Je 100 µL Stopplösung (14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Vorsicht ätzend!) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren; in derselben Reihenfolge wie beim Substrat: Farbumschlag von blau nach gelb. Die Festphase für ca. 10 Sekunden vorsichtig agitieren, am besten auf einem Schüttler.

h. Die Platte sofort im Mikrowell-Plattenphotometer bei 450 nm messen.

Überschüssige Reagenzien weiter bei $2 - 8^\circ\text{C}$ lagern, wenn sie später noch einmal verwendet werden sollen.

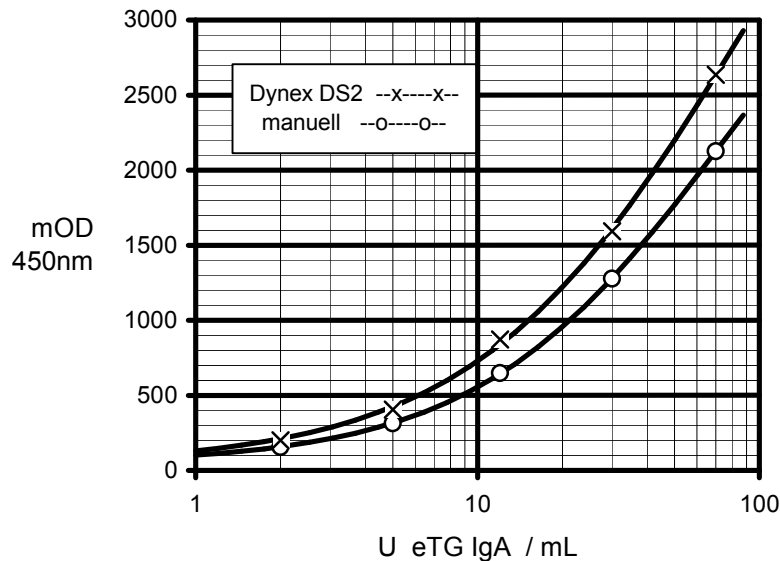
8.2. Dynex DS2 automatisches ELISA System

Der Test wurde validiert für die Verwendung mit dem Dynex DS2-Automaten. Eine Beschreibung des Programmablaufs für die Assay-Durchführung und -Auswertung kann als pdf-Datei zur Verfügung gestellt werden. Die Parameter dieses Programms sind nur als Vorschlag zu verstehen und müssen evtl. vom Anwender an die Erfordernisse des aktuellen Tests angepasst werden. Generell haben wir versucht, so eng wie möglich am manuellen Protokoll (s.o.) zu bleiben. Allerdings musste die Substrat-Inkubationsdauer verkürzt werden wegen der zwangsläufig erhöhten Temperatur innerhalb des Geräts.

Abschnitt 11.8. vergleicht Ergebnisse der manuellen Durchführung und des DS2 ELISA Systems.

9. Auswertung und Qualitätskontrolle

Quantitative Auswertung: Die Messdaten werden anhand einer Standardkurve quantitativ ausgewertet. Die unten dargestellte Kurve kann jedoch nicht die Messung der Standards bei der Testdurchführung ersetzen, zusammen mit den Kontrollen und den aktuellen Proben. Sie dient lediglich als Modell. Die Kurve wurde von einem üblichen ELISA Auswertungsprogramm mit einer 4-Parameter-Funktion errechnet; die Spline-Approximation ist ebenso geeignet.



2912FE00.FED/StdKurveV2410J

Steht keine Rechner-gestützte Auswertung zur Verfügung, so zeichnet man die Standardkurve per Hand und liest an ihr die AK-Konzentration in den Proben ab (U eTG IgA / mL Probe).

Qualitative Auswertung: Der Test kann auch auf qualitative Art ausgewertet werden. Dazu muss nur die positive Kontrolle gemessen werden; allerdings empfiehlt es sich, auch die negative Kontrolle zu messen (s.u.: Qualitätskontrolle).

Bei der qualitativen Testauswertung wird die Absorption der Proben mit der grenzwertigen Absorption (= cut-off) verglichen. Diese errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Absorptioncut-off} = \text{Absorptionpositive Kontrolle} \times \text{Faktor}$$

Der Faktor hängt von der Kit-Charge ab und ist im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben; dies liegt jedem Kit bei. Beispiel:

$$\begin{aligned} \text{Absorptionpositive Kontrolle} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{Faktor} &= 0,35 \\ \text{Absorptioncut-off} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie hoch positiv eine bestimmte Probe an eTG IgA ist, kann man ihre Ratio berechnen, nach der Formel:

$$\text{Ratio} = \text{Absorption}_{\text{Probe}} / \text{Absorption}_{\text{cut-off}}$$

Beispiel:

$$\begin{aligned} \text{Absorption}_{\text{cut-off}} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{Absorption}_{\text{Probe}} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{Ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

Qualitätskontrolle: Die positive und die negative Kontrolle dienen der Überprüfung des Tests. Ihre jeweiligen Sollwerte und akzeptablen Bereiche sind im Chargenspezifischen Analysen-Zertifikat angegeben. Die Messwerte der Kontrollen müssen innerhalb der Toleranzgrenzen liegen; ansonsten sind die Ergebnisse des Tests nicht gültig.

10. Interpretation der Ergebnisse / Grenzen der Methode

Auf der Basis einer Serienmessung von Blutspender- und Positiv-Seren (s.u.) schlagen wir für die Beurteilung von Patientenseren vor:

Auswertung	quantitativ U eTG IgA / mL Probe	qualitativ Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 2,6	< 0,90
cut-off	3,0	1,00
grenzwertiger Bereich	2,6 - 3,5	0,90 - 1,11
positiver Bereich	> 3,5	> 1,11

Diese Spezifikationen sind nur als Anhaltspunkt zu verstehen. Zu ihrer Überprüfung sollten in jedem Test Normalseren mitgeführt werden.

Ein negatives Ergebnis zeigt an, dass der Patient keinen erhöhten Titer an IgA-Antikörpern gegen eTG aufweist. Sind dennoch klinische Anzeichen der DH erkennbar, sollten IgA-Antikörper gegen tTG und/oder gegen MGP (Modified Gliadin Peptid) bestimmt werden (Gliadin ist der hauptsächliche antigene Bestandteil des Glutens). Es empfiehlt sich, IgG-Antikörper gegen tTG und MGP zu bestimmen, um ein falsch-negatives Resultat bedingt durch generelle IgA-Defizienz auszuschließen, die manchmal mit Zöliakie assoziiert ist (11). Auch Säuglinge und Kleinkinder könnten noch nicht den normalen IgA Antikörper-Titer entwickelt haben.

Ein positives Resultat sollte als Hinweis auf DH interpretiert werden. Zur Absicherung können IgA-Antikörper gegen tTG überprüft werden.

Proben mit grenzwertigen Resultaten sollten als zweifelhaft betrachtet und als solche berichtet werden. Es empfiehlt sich, nach etwa 2 Wochen eine weitere Probe zu messen, parallel mit der zuerst entnommenen, um eine mögliche Änderung des Antikörper-Titers zu erfassen.

Wie bei jedem serologischen Test sollten dessen Resultate nicht isoliert interpretiert werden, sondern im Zusammenhang mit den Symptomen des Patienten und anderen diagnostischen Kriterien.

11. Testcharakteristika

11.1. Standardisierung

Der Test wird mit einem gereinigten Serumpräparat standardisiert, das IgA-Antikörper enthält, die spezifisch gegen eTG gerichtet sind. Es wird seinerseits an einem Satz graduell-positiver Seren kalibriert, der ausschließlich für diesen Zweck reserviert ist. Der Grad der Reaktivität einer Probe wird in willkürlichen Einheiten (U/mL) angegeben, da kein internationaler Standard verfügbar ist.

11.2. Analytische Spezifität

Der Test weist spezifisch humane IgA-Antikörper nach, die gegen eTG gerichtet sind.

11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)

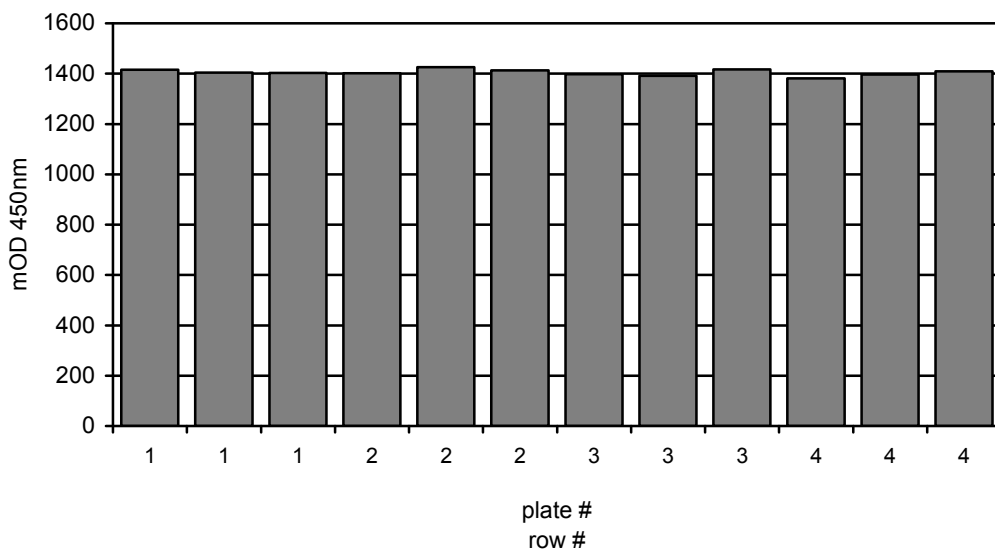
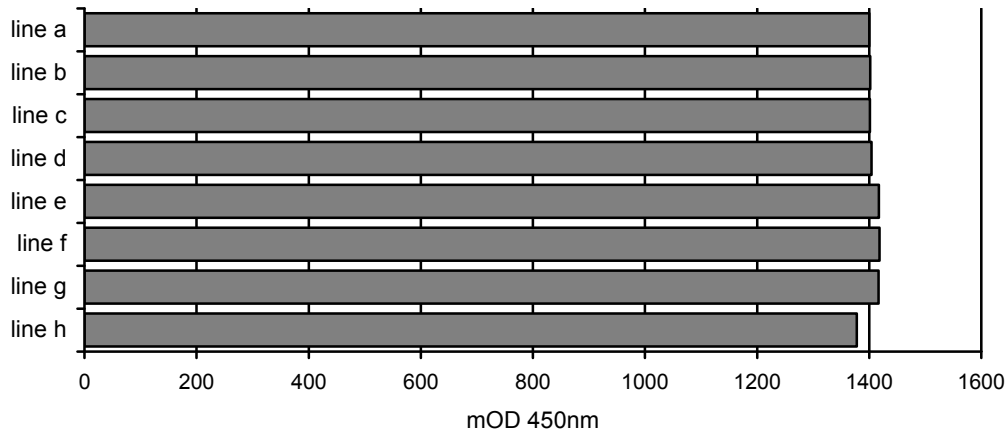
Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die dem OD-Mittelwert des Probenpuffers entspricht, zu dem die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu $< 0,5$ U eTG IgA / mL Probe bestimmt ($n = 24$).

Empfohlener Messbereich: 1 - 70 U / mL

11.4. Festphasen-Homogenität

Dieser Parameter ist regulärer Bestandteil der QC jeder Produktions-Charge. Die Homogenität wird bestimmt durch 288-fache Messung einer positiven, aber nicht sättigenden Probe auf 3 ausgewählten Platten. Akzeptanz-Kriterium: mOD-Variationskoeffizient (VK) über die Platten $< 8\%$. Die folgende Abbildung zeigt einen repräsentativen Auszug einer solchen Analyse (Ch.-Bez. der Festphase: 2505Q).

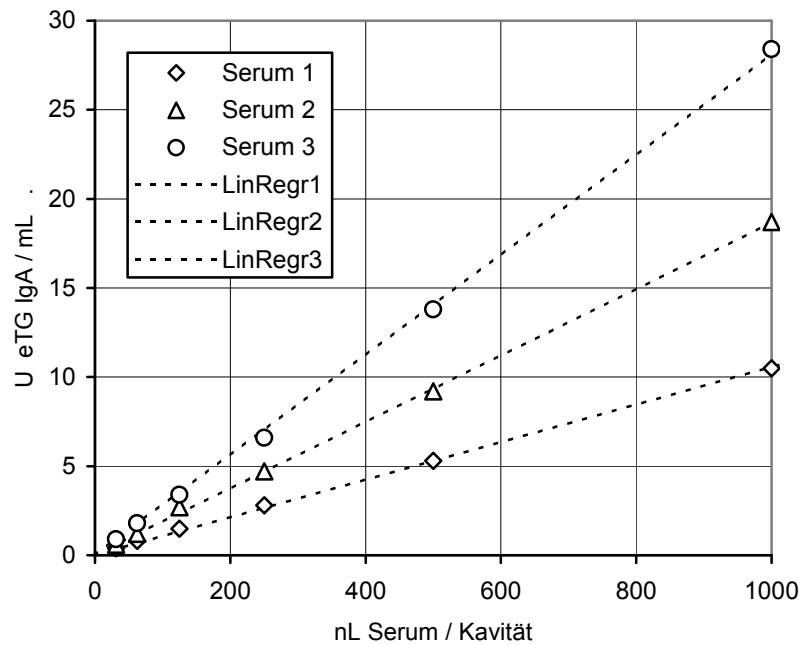
plate #	1	n/2	n	1	n/2	n	1	n/2	n	1	n/2	n	mean	cv %
row #	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4		
line a	1385	1401	1384	1414	1408	1408	1386	1381	1419	1379	1409	1429	1400	1,2
line b	1392	1407	1386	1402	1401	1418	1405	1372	1428	1422	1379	1408	1402	1,2
line c	1394	1405	1401	1389	1420	1423	1390	1386	1395	1367	1429	1416	1401	1,3
line d	1408	1399	1412	1399	1425	1389	1380	1394	1403	1389	1424	1427	1404	1,1
line e	1425	1412	1422	1417	1467	1423	1406	1398	1427	1387	1424	1402	1418	1,4
line f	1451	1404	1401	1412	1433	1422	1400	1413	1435	1397	1437	1419	1419	1,2
line g	1439	1419	1410	1407	1446	1430	1422	1407	1433	1404	1384	1397	1417	1,3
line h	1429	1390	1410	1375	1402	1388	1398	1376	1395	1310	1285	1379	1378	3,0
mean	1415	1405	1403	1402	1425	1413	1398	1391	1417	1382	1396	1410	1405	
cv %	1,7	0,6	0,9	1,0	1,6	1,1	0,9	1,1	1,2	2,4	3,6	1,2		1,7



2912FE00.FED/2505Q

11.5. Linearität

Um die Dosis / Wirkungs-Beziehung des Tests zu bestimmen, wurden positive Seren in serieller Zweifachverdünnung gemessen. Akzeptanz-Kriterium: Die lineare Regression vierer sukzessiver Verdünnungen muss einen Korrelationsfaktor > 0,98 ergeben. Ein typisches Ergebnis ist hier abgebildet.



2912FE00.FED/LinearV2410J

11.6. Präzision

Um die Präzision des Tests zu ermitteln, wurde die Variabilität der Ergebnisse unter folgenden Bedingungen ermittelt: a. innerhalb eines Assays und zwischen 3 Assays, b. zwischen 3 Anwendern und c. zwischen 2 Kit-Chargen.

a. Intra- und Inter-Assay Variabilität (n = 24 bzw. 72)

Probe	Mittelwert (MW) U/mL	Variabilität (VK, %)	
		intra-Assay	inter-Assay
1	5,4	1,1	1,4
2	9,5	1,6	1,8
3	28	1,7	2,8

b. Operator-zu-Operator Variabilität (n = 12)

Probe	MW U/mL	Variabilität (VK, %)
1	5,7	2,0
2	8,9	1,9
3	31	1,6

c. Variabilität zwischen 2 Kit-Chargen (n = 6)

Probe	MW U/mL	Variabilität (VK, %)
1	5,6	10,9
2	13	1,8
3	25	1,5

11.7. Häufigkeitsverteilung von eTG IgA

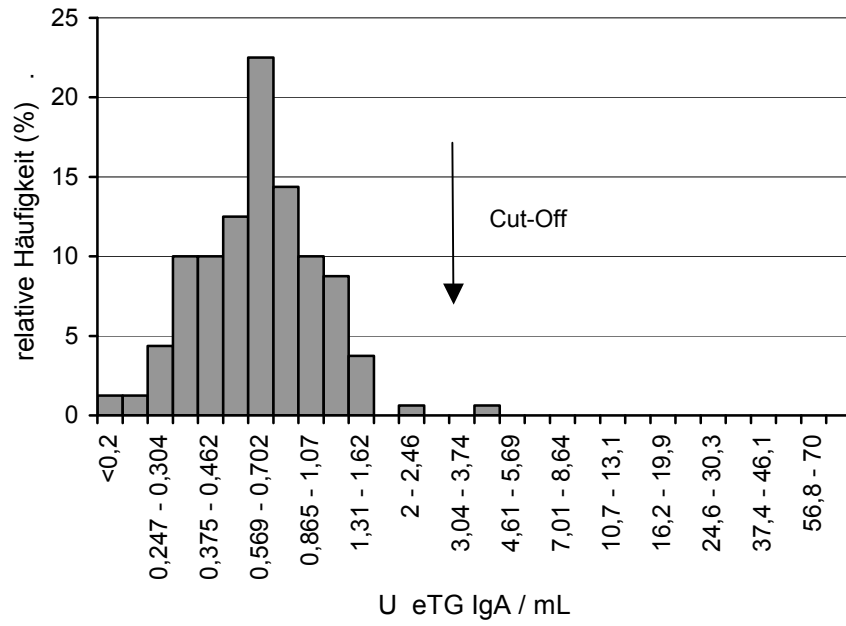
Diese wurde bestimmt in einem Blutspender-Serenkollektiv, gleichmäßig nach Alter und Geschlecht verteilt, und einem Serenkollektiv von CD-Patienten, die ein positives anti-tTG IgA-Resultat in einem CE-konformen Referenz-ELISA gezeigt hatten. Folgende Verteilung des Analyten wurde beobachtet:

Blutspender-Seren		positive Seren	
n:	160	n:	84
MW:	0,7 U/mL	MW:	5,5 U/mL
MW + s:	1,1 U/mL	MW - s:	< 0 U/mL
MW + 2s:	1,6 U/mL	MW - 2s:	< 0 U/mL
Median:	0,6 U/mL	Median:	0,7 U/mL
95. Perzentile:	1,3 U/mL	5. Perzentile:	0,2 U/mL

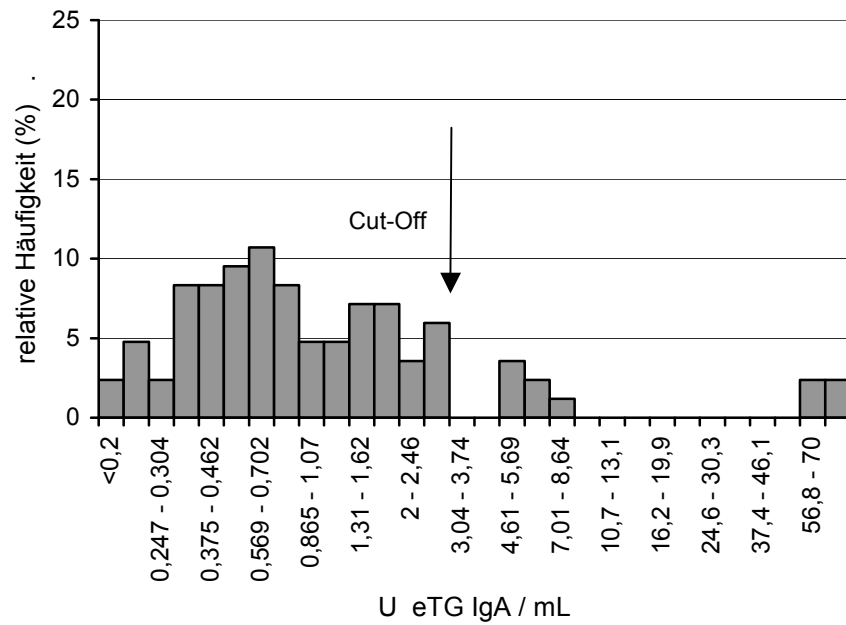
Auf der Grundlage der Häufigkeitsverteilung der eTG IgA unter den Blutspender-Seren wurde der Cut-Off des ELISAs zu 3,0 U/mL bestimmt. Dieser Wert entspricht einer diagnostischen Spezifität des Tests von ca. 99 %.

Bis heute steht uns kein klinisch definiertes Kollektiv DH-positiver Seren zur Verfügung; weshalb die Bestimmung der ELISA-Empfindlichkeit durch die übliche ROC-Analyse (12) noch aussteht. Allerdings entspricht die Häufigkeitsverteilung der eTG IgA im obigen CD-Patientenkollektiv dem erwarteten Muster: Während die meisten CD-Patienten eTG IgA-Titer ähnlich dem der Blutspender zeigen (vermutlich weil sie nicht von DH betroffen sind), sind vereinzelte Seren (ca. 12 %) deutlich positiv; im Unterschied zum Blutspender-Kollektiv, was den Zusammenhang zwischen CD und DH bestätigt.

Blutspender-Seren



tTG-IgA-positive Seren

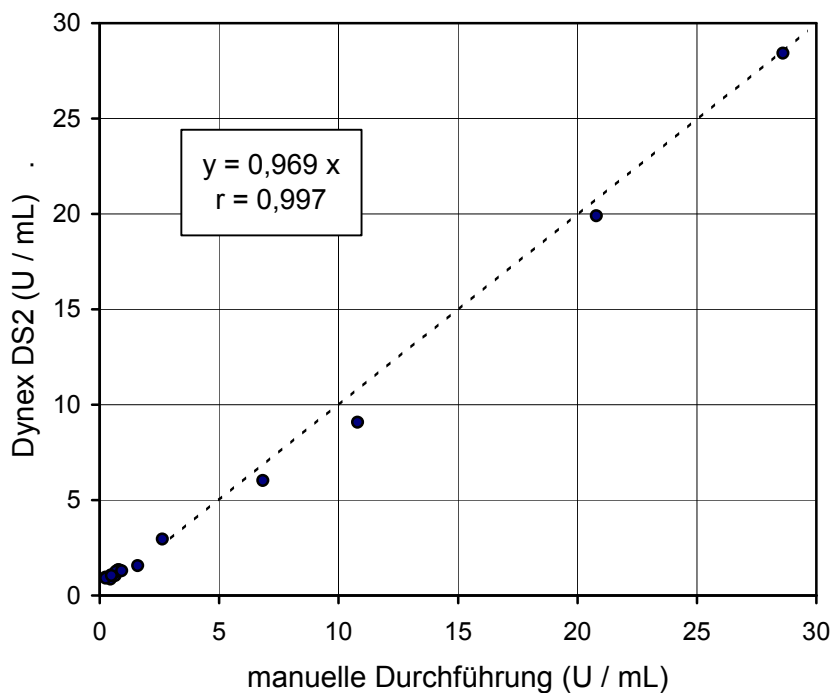


11.8. Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System
 Variabilität: Mit Testkits aus einer einzigen Produktions-Charge wurde die Variabilität der Assayergebnisse verglichen zwischen manueller Durchführung und dem automatischen DS2 ELISA System:

	manuelle Durchführung	Dynex DS2
intra-Assay Variabilität (n = 16)	mittl. VK = 2,2 %	mittl. VK = 2,9 %
inter-Assay Variabilität (n = 48)	mittl. VK = 3,4 %	mittl. VK = 3,4 %

Standardkurve: abgebildet in Abschnitt 9

Korrelation:



2912FE00.FED/KorrDynexDS2-V2410J

12. Garantie und Haftung

Steffens biotechnische Analysen GmbH (SBA) garantiert, dass das ausgelieferte Produkt gründlich getestet wurde, um sicherzustellen, dass es seine Spezifikationen erfüllt und der hier gegebenen Beschreibung entspricht. Weitergehende Garantien werden nicht gegeben.

Die hier genannten Testcharakteristika wurden mit der angegebenen Methode ermittelt. Jede Änderung der Methode kann die Ergebnisse beeinflussen. In einem solchen Fall verweigert SBA jede Haftung, ob ausgesprochen, impliziert oder gesetzlich. Darüber hinaus kann SBA keinerlei Haftung für Schäden übernehmen, die aufgrund einer unkorrekten Lagerung oder Anwendung des Produktes entstanden sind; direkt, indirekt oder als Konsequenz.

13. Symbole



Artikel-Bezeichnung



Chargen-Bezeichnung



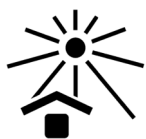
Enthält x Bestimmungen



Für *in vitro* diagnostische Anwendung



Conformité Européenne



Lichtgeschützt aufbewahren



Bei 2 - 8°C lagern



Verfallsdatum



“Gebrauchsinformation” lesen



Warnung



Biologisches Risiko



Hergestellt von

14. Literatur

1. Cunha, P. R., Barraviera, S. R. C. S.: Dermatoses bolhosas autoimunes. *An Bras Dermatol* 84 (2009), 111 - 124
2. Green, P. H., Cellier, C.: Celiac disease (Review). *N Engl J Med* 357 (2007), 1731 - 1743
3. Katz, S. I., et al.: Dermatitis herpetiformis: the skin and the gut. *Ann Intern Med* 93 (1980), 857 - 874
4. Nicolas, M. E. O., et al.: Dermatitis herpetiformis. *Int J Dermatol* 42 (2003), 588 - 600
5. Hertl, M., Zillikens, D.: Clinical and molecular characterization of autoimmune bullous diseases. *J Invest Dermatol* 128 (2008), E19 – E21
6. Dieterich, W., et al.: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Med* 3 (1997), 797 - 801
7. Sárdy, M., et al.: Epidermal transglutaminase (Tgase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med* 195 (2002), 747 - 757
8. Rose, C., et al.: Autoantibodies against epidermal transglutaminase are a sensitive diagnostic marker in patients with dermatitis herpetiformis on a normal or gluten-free diet. *J Am Acad Dermatol* 61 (2009), 39 - 43
9. Hull, C. M., et al.: Elevation of IgA anti-epidermal transglutaminase antibodies in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 159 (2008), 120 - 124
10. Jaskowski, T. D., et al.: IgA anti-eTG in dermatitis herpetiformis and pediatric celiac disease. *J Invest Dermatol* 129 (2009), 2728 - 2730
11. Collin, P., et al.: Selective IgA deficiency and coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 27 (1992), 367 - 371
12. Sommer, R., and Eitelberger, F.: Wertigkeit der Gliadin-Antikörper im Serum zur Diagnose der Zöliakie. *Wien Klin Wochenschr* 104/4 (1992), 86 - 92

15. Kurzanleitung

- a. Die Proben 1/100 in Probenpuffer (100 mL, gebrauchsfertig, orange) verdünnen und durchmischen.
- b. Das 10x-Konzentrat des Waschpuffers (100 mL, blau) mit Wasser verdünnen und durchmischen.
- c. Die Kavitäten der Festphase einmal mit je 350 μ L Waschpuffer waschen. Dann je 100 μ L der Standards (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau), der Kontrollen (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot) und der verdünnten Proben in die Kavitäten pipettieren. Doppelbestimmungen sind zu empfehlen. 30 Minuten bei Raumtemperatur ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) inkubieren.
- d. Die Kavitäten 4x mit je 350 μ L Waschpuffer waschen.
- e. Je 100 μ L des Konjugats (14 mL, gebrauchsfertig, gelb) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c.
- f. Waschschrift d wiederholen.
- g. Je 100 μ L des Substrats (14 mL, gebrauchsfertig, in einem schwarzen Fläschchen) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c. Dann je 100 μ L Stoplösung (14 mL, gebrauchsfertig, farblos) zusetzen und die Platte kurz schütteln.
- h. Sofort die Absorption bei 450 nm messen.
- i. Quantitative Auswertung: Die Standardkurve ermitteln und anhand dieser Kurve die Absorption der Proben in ihre jeweilige Antikörper-Konzentration (U/mL) umformen.
- j. Qualitative Auswertung: Die grenzwertige Absorption ermitteln, indem die Absorption der positiven Kontrolle mit dem Faktor multipliziert wird, der im Analysen-Zertifikat angegeben ist. Dann die Ratio-Werte der Proben berechnen, indem ihre Absorption durch die grenzwertige Absorption dividiert wird.