

Nur für "In-Vitro Diagnostik"

CLIA Kompliziertheit: Hoch

Verwendungszweck

Der QUANTA Lite™ Celiac DGP Screen ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) für den semiquantitativen Nachweis von IgA- und IgG-Antikörpern gegen synthetische, desamidierete Gliadin-abgeleitete Peptide in Humanserum. Das Vorhandensein dieser desamidierter Peptid-Antikörper kann in Verbindung mit klinischen Befunden und anderen Labortests bei der Diagnose von Zöliakie mit und ohne IgA-Mangel sowie Dermatitis herpetiformis helfen.

Informationen zum Test

Zöliakie oder gluteninduzierte Enteropathien sind chronische Erscheinungen, deren Hauptmerkmale in Entzündungen und charakteristischer histologischer Atrophie der intestinalen Mucosa bestehen, die sich in einem Malabsorptionssyndrom manifestieren. Die genaue Ätiologie dieser Erkrankung ist unbekannt, jedoch ist Gliadin oder die alkohollösliche Teil des Weizenglutens klar als toxisches Agens bekannt.¹

Ursprünglich wurde zur Diagnose von Zöliakie und der damit verbundenen Beschwerden eine Reihe von multiplen Darmbiopsien eingesetzt. Später wurden serologische Verfahren zum Screenen von Patienten mit Verdacht auf gluteninduzierte Enteropathie sowie zum Monitoring von glutenfreier Diät vorgeschlagen.²⁻⁵ Die Europäische Gesellschaft für pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung (ESPGAN) hat die Verwendung von serologischen Markern wie Gliadin und Retikulin sowie endomysialen Antikörpern empfohlen, um die Anzahl intestinaler Biopsien zur Diagnose zu reduzieren.⁶

Aktuelle Arbeiten haben gezeigt, dass Gliadinreaktive Antikörper von Zöliakie-Patienten eine sehr beschränkte Anzahl spezifischer Epitope auf dem Gliadin-Molekül binden.^{7,8} Mit denselben Studien lässt sich weiterhin nachweisen, dass die selektive Desamidierung von Gliadin durch das Zöliakie-assoziierte Enzym Gewebe-Transglutaminase eine verstärkte Bindung an Anti-Gliadin-Antikörper zur Folge hat. Basierend auf den oben genannten Beobachtungen haben Assays, die desamidierete und definierte Peptide verwenden, gezeigt, dass sie für Zöliakie verglichen mit den Anti-Gliadin- und tTG Standardassays eine höhere diagnostische Genauigkeit aufweisen.^{9,10,11}

Sowohl Gliadin IgA als auch IgG Antikörper werden in Seren von Patienten mit gluteninduzierten Enteropathien nachgewiesen.^{2,3} Eine sensitive Screening-Strategie für Risikopopulationen beinhaltet das Testen von IgG und IgA Antikörpern, da ein signifikanter Teil der Zöliakiepatienten IgA-defizient sind.¹² Gliadin IgA Antikörper sind von Interesse beim Verfolgen der Krankheitsaktivität über einen bestimmten Zeitraum und zum Monitoring des Einhaltens glutenfreier Diät.⁵

Dermatitis herpetiformis (DH) ist eine Hautkrankheit, die, wie die Zöliakie, durch die Aufnahme von Gluten, das in vielen Getreidesorten vorkommende Klebereiweiß, verursacht wird. Bei den meisten DH-Patienten tritt wie bei Zöliakiepatienten eine Dünndarmatrophie (Abflachung der Zotten) auf. Eine strenge glutenfreie Diät verbessert sowohl die Darm- als auch die Hautläsionen.^{13,14} Die üblichen serologischen Diagnostiktests, wie EMA- und tTG-Assays, führen beim Prüfen auf DH zu enttäuschenden Ergebnissen. Die Empfindlichkeit dieser Assays liegt bei nur 60-75%^{15,16} im Vergleich zu einer 95%igen oder noch höheren Empfindlichkeit bei Zöliakie.

Der QUANTA Lite™ Zöliakie DGP Screen ist ein verbesserter Leistungstest für den gleichzeitigen Nachweis von IgA- und IgG-Antikörpern für ein selektiv desaminiertes, synthetisches Peptid, das von dem Weizeneiweiß Gliadin abstammt, und daher für den Nachweis von Zöliakie auch bei gleichzeitig vorhandenem IgA-Mangel geeignet ist.

Testprinzip

Gereinigte synthetisch Gliadin-Peptide werden unter Bedingungen, die die Antigene in ihrem nativen Zustand erhalten, an die Kavitäten einer Polystyrol-Mikrotiterplatte gebunden. Vorverdünnte Kontrollen und verdünnte Patientenserum werden in verschiedene Kavitäten pipettiert. Die vorhandenen Gliadin Peptid IgA und IgG Antikörper binden an das Antigen. Der Rest der Probe/Kontrolle wird durch Waschen entfernt. Enzymmarkiertes anti-humanes IgA und/oder IgG wird in die Kavitäten pipettiert und bindet während einer zweiten Inkubation an den Patienten-Antikörper. Nachdem in einem weiteren Waschschriff das restliche Konjugat entfernt worden ist, wird ein Chromogen-Substrat zugegeben. Die Intensität der entstandenen Farbreaktion wird nach dem Abstoppen mit dem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die quantitative Auswertung erfolgt durch einen Vergleich der Extinktionswerte der Patienten mit dem Wert eines Kalibrators.

Inhalt der Testpackung

1. Mit gereinigten Gliadin-Peptiden beschichtete ELISA-Mikrotiterplatte aus Polystyrol (12-1 x 8 Kavitäten), mit Streifenhalter in Folienverpackung und Trockenmittel
2. ELISA Negative Kontrolle, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum ohne humane Antikörper gegen Gliadin Peptides IgA oder IgG, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
3. Celiac DGP Screen ELISA Low Positive (Kalibrator), 1 Röhrchen Puffer, das Stabilisator und IgA- und IgG-Antikörper gegen Gliadinpeptide im Humanserum enthält gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
4. Celiac DGP Screen ELISA High Positive (positive Kontrolle), 1 Röhrchen Puffer, das Stabilisator und IgA- und IgG-Antikörper gegen Gliadinpeptide im Humanserum enthält, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
5. HRP Probenverdünner, 1 Flasche – rosa gefärbt mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung, Tween 20, Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, 50 mL
6. HRP Waschkonzentrat, 1 Flasche mit 40fachem Konzentrat – rot gefärbt mit gepufferter Kochsalzlösung und Tween 20, 25 mL. Zur Verdünnung bitte das entsprechende Kapitel in der Anleitung beachten.

7. HRP Ig G/A Konjugat, (Ziege), anti-humanes IgA und IgG, 1 Flasche – farblos mit Puffer, Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, 10 mL
8. TMB Chromogen, 1 Flasche mit Stabilisatoren, 10 mL
9. HRP Stopplösung, 0,344M Schwefelsäure, 1 Flasche – farblos, 10 mL

Hinweise

1. VORSICHT: Probenverdünner, Kontrollen und Konjugat enthalten 0,02% Chloramphenicol. Es ist im US-Bundesstaat Kalifornien und allgemein bekannt, daß dieser Stoff Krebs verursachen kann.
2. Alle Reagenzien für die Herstellung dieses Tests wurden auf Antikörper gegen HIV, HBsAg und HCV getestet und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kontrollen wie potentiell infektiöses Humanserum oder Blutproben behandelt werden.¹⁷
3. NaN₃ wird als Stabilisator verwendet. NaN₃ ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen verursachen. Vorsichtig handhaben, und Kontakt mit Augen und Haut vermeiden! Den Kontakt mit Metall, basischen Stoffen oder anderen Komponenten, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Bei der Entsorgung von Reagenzien ist daher mit viel Leitungswasser nachzuspülen, um Ansammlungen im Abwassersystem zu verhindern.
4. Das HRP Konjugat enthält eine verdünnte Chemikalie, die bei Einnahme toxisch wirken kann. Daher den Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
5. Das TMB Chromogen enthält ein Reizmittel, das bei Inhalation, Einnahme oder Absorption durch die Haut gesundheitliche Schäden verursachen kann. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
6. Die HRP Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure. Den Kontakt mit Basen, Metallen und anderen Stoffen, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Schwefelsäure ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen hervorrufen. Den Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
7. Die vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung während der Arbeit mit Reagenzien tragen.
8. Verschüttete Reagenzien sofort beseitigen. Bei der Entsorgung von Abfällen alle Umweltvorschriften beachten.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Dieser Test ist für "In-Vitro Diagnostik".
2. Die Verwendung anderer als im Testkit vorhandenen Komponenten kann zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.
3. Unvollständiges Waschen und ungenügendes Entfernen der Flüssigkeiten aus den ELISA Kavitäten führt zu einer schlechten Präzision und zu hohen Hintergrund-Extinktionen.
4. Die Adaptation dieses Testsystems auf automatische Probenverarbeitung und andere Instrumentierung, ganz oder teilweise, kann unterschiedliche Ergebnisse zur manuellen Durchführung ergeben. Es liegt in der Verantwortung eines jeden Labors, die automatische Bearbeitung so zu überprüfen, daß Testergebnisse innerhalb akzeptabler Bereiche erzielt werden.
5. Eine Reihe von Faktoren beeinflusst das Testergebnis. Hierzu zählen die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Pipettierens, der Typ des verwendeten Photometers, die Temperatur der Reagenzien, die Umgebungs-Temperatur, die Gründlichkeit des Waschens und der Entfernung der Flüssigkeiten aus den Vertiefungen der ELISA-Streifen, und die Einhaltung der Inkubationszeiten. Es ist deshalb sehr wichtig, für gleichbleibende Bedingungen zu sorgen.
6. Die strikte Einhaltung der Testprozedur wird empfohlen. Jede Änderung im Protokoll erfolgt auf Risiko des Anwenders.
7. Das unvollständige Verschließen der Mikrotiterkavitäten und des Trockenmittels führt zu Antigenabbau und schlechter Präzision.
8. Eine unakzeptabel niedrige Absorption kann beobachtet werden, wenn eine Flasche HRP Konjugat bei **zwei-** oder mehrfachem Gebrauch über einen längeren Zeitraum benutzt wird. Daher ist es wichtig, die Hinweise zum Umgang mit dem HRP Konjugat genau zu beachten.
9. Chemische Kontamination des HRP Konjugates kann durch unzureichendes Reinigen oder Spülen der Ausrüstung oder der Instrumente verursacht werden. Rückstände gebräuchlicher Laborchemikalien wie z.B. Formalin, Bleichmittel, Ethanol oder Spülmittel führen zum Abbau des HRP Konjugates im Verlauf der Zeit. Das gründliche Spülen der gesamten Ausrüstung und Instrumentierung nach Verwendung chemischer Reinigungsmittel ist daher unbedingt erforderlich.

Lagerung

1. Lagerung aller Kit-Reagenzien bei 2-8°C. Nicht einfrieren. Die Reagenzien sind stabil bis zum Ende des Haltbarkeitsdatums bei vorschriftsmäßiger Lagerung und Handhabung.
2. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen wieder in die Originalverpackung geben, luftdicht verschließen und in den Kühlschrank zurücklegen.
3. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2-8°C eine Woche stabil.

Proben

Die Testdurchführung sollte mit Serumproben erfolgen. Werden Azide oder andere Stabilisatoren zu den Serumproben gegeben, können die Ergebnisse nachteilig beeinflusst werden. Mikrobakteriell kontaminierte, hämolytische, lipämische oder durch Hitze einwirkung inaktivierte Proben sollten nicht verwendet werden. Nach der Blutentnahme ist das Serum vom Blut zu trennen.

Das CLSI (NCCLS) Dokument H18-A3 empfiehlt die folgenden Lagerungsbedingungen für Patientenproben: 1) Proben bei Raumtemperatur nicht länger als 8 Stunden lagern. 2) Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 8 Stunden erfolgen, die Proben bei 2-8°C kühl lagern. 3) Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 48 Stunden erfolgen ist die Probe bei -20°C oder niedriger einzufrieren. Eingefrorene Proben müssen nach dem Auftauen und vor der Testung gut geschüttelt werden.¹⁸

Testdurchführung

In der Testpackung vorhandenes Material

- 1 Celiac DGP Screen ELISA Mikrotiterplatte (12-1 x 8 Kavitäten), mit Streifenhalter
- 1 1,2 mL vorverdünnte ELISA Negative Kontrolle
- 1 1,2 mL vorverdünnte Celiac DGP Screen ELISA Low Positive Kontrolle
- 1 1,2 mL vorverdünnte Celiac DGP Screen ELISA High Positive Kontrolle
- 1 50 mL HRP Probenverdünner
- 1 25 mL HRP Waschkonzentrat, 40faches Konzentrat
- 1 10 mL HRP Ig G/A Konjugat (von der Ziege), anti-humanes IgG und IgA
- 1 10 mL TMB Chromogen
- 1 10 mL HRP Stopplösung, 0,344M Schwefelsäure

Zusätzliches benötigtes Material

- Pipetten für 5, 100, 200-300 und 500 µL
- Einmal-Pipettenspitzen
- Eppendorf-Reaktionsgefäße für die Serumverdünnung, 4 mL Volumen
- Distilliertes oder deionisiertes Wasser
- 1 L Gefäß für verdünntes HRP Waschkonzentrat
- Reader für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (und 620 nm für eine bichromatische Messung)

Methode

Testvorbereitung

1. Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen (20-26°C) und gründlich mischen.
2. Den gesamten Inhalt (25 mL) des Waschkonzentrats mit 975 mL Aqua dest. mischen (1:40 Verdünnung). Die verdünnte Pufferlösung ist bei 2-8°C eine Woche stabil. Soll nicht die gesamte Mikrotiterplatte auf einmal verwendet werden, so können für einen Ansatz von 16 Kavitäten 2 mL Konzentrat mit 78 mL Aqua dest. gemischt werden.
3. Serumproben 1:101 verdünnen, indem 5 µL Serum mit 500 µL gebrauchsfertigem Probenverdünner gemischt werden. Verdünnte Proben sollen innerhalb von 8 Stunden getestet werden. Der Celiac DGP Screen ELISA Low Positive Kontrolle, die Celiac DGP Screen ELISA High Positive Kontrolle und die ELISA Negative Kontrolle **nicht verdünnen**.
4. Jeder Test benötigt zwei Kavitäten für jede der drei Kontrollen sowie eine oder zwei Kavitäten für die Patientenprobe (Es wird empfohlen, alle Proben in Doppelbestimmung anzusetzen, bis die erforderliche Präzision und Reproduzierbarkeit erreicht sind).

Testdurchführung

1. **ALLE REAGENZIEN UND PATIENTENPROBEN AUF RAUMTEMPERATUR (20-26°C) BRINGEN.** Die entsprechende Anzahl Mikrotiterkavitäten abrechnen. Die Kavitäten im Rahmen befestigen. **Die unbenutzten Kavitäten wieder in die Originalverpackung geben, luftdicht verschließen und in den Kühlschrank zurücklegen, um Verdunstung zu minimieren.**
2. Je 100 µL der **gebrauchsfertigen** Celiac DGP Screen ELISA Low Positive Kontrolle, der Celiac DGP Screen ELISA High Positive Kontrolle, der ELISA Negative Kontrolle und der verdünnten Patientenproben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Streifen abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren. Die Inkubationszeit beginnt nach Zugabe der letzten Probe.
3. Waschen: Den Inhalt aller Kavitäten absaugen. Die Kavitäten vollständig (200-300 µL) mit **verdünntem** HRP Waschlösung füllen und dann gründlich absaugen. Diesen Waschschrift noch zweimal wiederholen (Insgesamt: drei Waschschrift). Anschließend die Platte auf saugfähigem Papier ausklopfen, um restliche Waschlösung zu entfernen. Die Waschschrift sind in der selben Reihenfolge wie die Pipettierschrift durchzuführen.
4. 100 µL des HRP Ig G/A Konjugates in jede Kavität geben. Sterile Pipetten verwenden! Nur das benötigte Volumen an Konjugat aus der Flasche entnehmen. **UNBENUTZTES KONJUGAT NICHT IN DIE FLASCHE ZURÜCKPIPETTIEREN. KONTAMINATIONSGEFAHR!!** Abgedeckte Streifen bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren, wie in 2. beschrieben.
5. Waschen: Schritt Nr. 3 wiederholen.
6. 100 µL TMB Chromogen in jede Kavität geben. 30 Minuten **im Dunkeln** bei Raumtemperatur inkubieren.
7. 100 µL HRP Stopplösung in jede Kavität pipettieren. Bei der Hinzugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Zeitplan wie bei der Hinzugabe des TMB Chromogens einhalten. Die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln.
8. Die optische Dichte (OD) jeder Kavität bei 450 nm innerhalb einer Stunde nach Abstoppen der Reaktion ablesen. Es wird eine bichromatische Messung mit 620 nm als Referenzwellenlänge empfohlen.

Qualitätskontrolle

1. Der Celiac DGP Screen ELISA Low Positive Kontrolle, die Celiac DGP Screen ELISA High Positive Kontrolle und die ELISA Negative Kontrolle sollten bei jedem Testansatz mitgeführt werden, um sicherzustellen, daß alle Reagenzien und der Testansatz insgesamt ordnungsgemäß funktionieren.
2. Da der Celiac DGP Screen ELISA Low Positive Kontrolle, die Celiac DGP Screen ELISA High Positive Kontrolle und die ELISA Negative Kontrolle **vorverdünnt** sind, entfällt der Verdünnungsschrift der Patientenproben für die Kontrollen.
3. Zusätzliche Kontrollen zur Qualitätssicherung können gemäß den Richtlinien nationaler oder internationaler Regulierungs- oder Akkreditierungsbehörden eingesetzt werden. Geeignete

Kontrollen können aus Humanserum gewonnen und bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

4. Um sicher zu sein, daß alle Patientenwerte korrekt sind, müssen die nachfolgenden Kriterien erfüllt werden (Würden ein oder mehrere Kriterien nicht erfüllt, so ist das Ergebnis als ungültig zu betrachten und der Testansatz ist zu wiederholen).
 - a. Die Absorption der vorverdünnten Celiac DGP Screen ELISA High Positive Kontrolle muß größer sein als die Absorption des vorverdünnten Celiac DGP Screen ELISA Low Positive Kontrolle. Die Absorption der Low Positive Kontrolle wiederum muß größer sein als die der vorverdünnten ELISA Negative Kontrolle.
 - b. Die Absorption der vorverdünnten Celiac DGP Screen ELISA High Positive Kontrolle muß größer als 1,0 sein, die Absorption der vorverdünnten Negative Kontrolle darf nicht über 0,2 liegen.
 - c. Die Absorption des Celiac DGP Screen ELISA Low Positive muß mehr als doppelt so hoch sein wie die der ELISA Negative Kontrolle oder über 0,25 liegen.
 - d. Die ELISA Negative Kontrolle und Celiac DGP Screen ELISA High Positive Kontrolle dienen der Sicherstellung der ordnungsgemäßen Funktionsweise des Testansatzes. Die Celiac DGP Screen ELISA High Positive Kontrolle stellt die Präzision am Cut-off des Tests nicht sicher.
 - e. Der Anwender sollte unter anderem das CLSI (NCCLS) Dokument Nr. C24-A2 für zusätzliche Hinweise zur zeitgemäßen Qualitätskontrolle beachten.¹⁹

Berechnung der Ergebnisse

Zunächst sind die Mittelwerte der OD für die Doppelbestimmungen zu berechnen. Alle weiteren Berechnungen werden dann mit den entsprechenden Mittelwerten durchgeführt. Die Reaktivität jeder Patientenprobe wird bestimmt durch die Division des Mittelwertes der Proben-OD durch den Mittelwert der Low Positive Kontrolle und der Multiplikation dieses Ergebnisses mit dem chargenspezifischen Wert der Celiac DGP Screen ELISA Low Positive Kontrolle. Die chargenspezifischen Werte sind auf dem Fläschchenetikett aufgedruckt.

$$\text{Probenwert (Units)} = \frac{\text{OD der Probe}}{\text{Celiac DGP Screen ELISA Low Positive Kontrolle OD Wert}} \times \text{Celiac DGP Screen ELISA Low Positive Kontrollwert (Units)}$$

Die Reaktivität verhält sich zur Konzentration der vorhandenen Antikörper nicht linear. Zunahme und Abnahme der Antikörperkonzentrationen von Patienten werden durch einen entsprechenden Anstieg oder Abfall der Reaktivität angezeigt, diese Änderungen sind jedoch nicht proportional (d.h. eine Verdoppelung der Antikörperkonzentration führt nicht zu einer Verdoppelung der Reaktivität).

Interpretation der Ergebnisse

Dieser ELISA-Test ist sehr sensitiv und in der Lage, sogar kleine Unterschiede in Patientenpopulationen zu messen. Die folgenden Werte dienen als Beispiel für die Interpretation der Testergebnisse. Es wird empfohlen, daß sich jedes Labor seine eigenen Normalwerte, basierend auf eigener Technik, Kontrollen, Ausrüstung und Patientenpopulation erarbeitet.

Die Patientenprobe kann anschließend als negativ, schwach, deutlich positiv bis stark positiv klassifiziert werden.

	Units
Negativ	<20
Schwach positiv	20-30
Deutlich positiv bis	
Stark positiv	>30

1. Ein positives Ergebnis zeigt das Vorhandensein von Gliadin IgA und/oder IgG Antikörper an und legt die Möglichkeit des Vorkommens gluteninduzierter Enteropathien wie Zöliakie und Dermatitis Herpetiformis nahe.
2. Ein negatives Ergebnis deutet auf das Nichtvorhandensein von Gliadin IgA oder IgG Antikörpern oder auf Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des Testsystems hin.
3. Wir schlagen vor, die Laborergebnisse mit folgendem Hinweis zu versehen: „Die folgenden Ergebnisse wurden mit dem INOVA QUANTA Lite™ Celiac DPG Screen ELISA erzielt. Gliadin IgA und/oder IgG Werte, die mit Testsystemen anderer Hersteller erzielt wurden, können nicht untereinander ausgetauscht werden. Die Höhe des gefundenen Antikörper-Titers kann nicht mit einem Endpunkttiter in Korrelation gebracht werden.“

Grenzen des Verfahrens

1. Ein negatives Ergebnis bei einem unbehandelten Patienten schließt eine glutensensitive Enteropathie nicht völlig aus. Negative Proben können auf andere mit Zöliakie in Verbindung stehende Antikörper wie endomysiale IgA-Antikörper (EMA) oder IgA-Antikörper gegen Gewebe-Transglutaminase (tTG) erneut getestet werden.
2. In behandelten Patienten, die IgA Antikörper aufweisen, stellen Gliadin IgA Antikörperwerte einen besseren Indikator als Gliadin IgG Antikörper-Konzentrationen für die Einhaltung der Diät dar.⁵
3. Falsche Positivergebnisse (hohe Antikörperwerte ohne typische histologische Befunde) sind möglich. Nur selten reagieren die Antikörper bei anderen gastrointestinalen Beschwerden und Normalproben auf das DGP-Antigen.
4. Die Assoziation zwischen Dermatitis Herpetiformis und gluteninduzierter Enteropathie ist so stark, daß angenommen wird, daß beide Erkrankungen die gleiche Ätiologie besitzen. Bei diesen Patienten ist die Bestimmung von Gliadinantikörpern zum Nachweis von asymptomatischen Zöliakieerkrankungen und zur Gradabschätzung des gastrointestinalen Geschehens sinnvoll.^{13,14}

5. Anhand dieses Tests können gleichzeitig IgA- und IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Wird eine individuelle Bestimmung von spezifischen IgA- oder IgG-Antikörpern bevorzugt, können von INOVA eigens dafür vorgesehene IgA- und IgG-ELISA-Kits bezogen werden (QUANTA Lite™ Gliadin IgA II und QUANTA Lite™ Gliadin IgG II).
6. Ergebnisse dieses Testes müssen im Zusammenhang mit klinischen Ergebnissen und anderen serologischen Tests verwendet werden.
7. Die Leistungscharakteristika für andere Untersuchungsmaterialien als Serum wurden nicht bestimmt.

Erwartungswerte

Die Eignung des QUANTA Lite™ Celiac DGP Screen zum Nachweis von Gliadin-IgG- und IgA-Antikörpern wurde durch einen Vergleich mit den Enzymimmunoassays QUANTA Lite™ Gliadin IgA II und QUANTA Lite™ Gliadin IgG II evaluiert.

Normalbereich

Bei einer randomisierten Studie wurden 497 asymptomatische, gesunde Personen mit Wohnsitz in den USA auf Antikörper gegen DGP geprüft. Zu dieser Gruppe gehörten 300 Blutspender im Alter von 14 – 78 Jahren und eine gleiche Anzahl an Männern und Frauen. Vier Proben (0,8%) lagen über dem Cutoff-Wert von 20 Einheiten. Zwei Proben waren nur schwach positiv mit Werten von 20,1 und 20,2 Einheiten, und eine Probe war mit einem Wert von 46,6 Einheiten mäßig positiv. Die vierte Positivprobe mit 25,4 Einheiten deutete auf eine echte Zöliakie hin, da sie außerdem stark positiv für IgA-Antikörper gegen Gewebe-Transglutaminase (57 Einheiten) war. Der Mittelwert der 497 Proben betrug 3,17 Einheiten. Die Standardabweichung der Proben betrug 3,0 Einheiten. Der Mittelwert war 6 Standardabweichungen unter dem Cutoff-Wert von 20 Einheiten.

Spezifische Leistungscharakteristika

Vergleich mit gleichartigen Produkten

101 Proben von drei Zöliakie-Referenzlabors wurden intern mit dem QUANTA Lite™ Celiac DGP Screen sowie mit den Enzymimmunoassay-Kits QUANTA Lite™ Gliadin IgA II und QUANTA Lite™ Gliadin IgG II getestet. Diese Ergebnisse zusätzlich zu den 497 Normalproben sind weiter unten dargestellt.

N= 598	Gliadin IgG II und/oder Gliadin IgA II		
		Positiv	Negativ
Celiac DGP Screen	Positiv	39	3*
	Negativ	11**	545

Positiv prozentuale Übereinstimmung: 39/50 (78,0%)

Negativ prozentuale Übereinstimmung: 545/548 (99,4%)

Gesamtübereinstimmung: 548/598 (91,6%)

*Unter den 3 positiven Proben beim Celiac DGP Screen, die jedoch mit den beiden Gliadin II-Standardkits negative Ergebnisse ergaben, waren 2 Zöliakiepatienten mit einer glutenfreien Diät (28,7 bzw. 20,9 Einheiten). Der dritte Patient war ein Verwandter ersten Grades von dem Zöliakiepatienten mit 20,2 Einheiten.

**Von den 11 Proben, die bei dem Test mit dem Celiac DGP Screen-Kit negativ abschnitten, bei beiden Gliadin II-Standardkits jedoch positiv, waren 9 aus der Normalstudie. Die restlichen beiden stammten von Zöliakiepatienten auf glutenfreier Diät. Die eine Probe ergab 20,1 Einheiten mit dem Gliadin-IgG II-Kit und die andere 25,3 Einheiten mit dem Gliadin IgA II-Kit.

Klinischen Studien

In internen und externen klinischen Studien wurden mit dem QUANTA Lite™ Celiac DGP Screen Proben getestet, die klinisch als Zöliakiepatienten, IgA-defiziente Zöliakiepatienten, Zöliakiepatienten mit glutenfreier Diät, Verwandte ersten Grades eines Zöliakiepatienten, Dermatitis herpetiformis-Patienten, IgA-defiziente Kontrollen oder Nicht-Zöliakie-Patienten definiert worden waren. Eine Zusammenfassung der klinisch definierten Proben und 517 der Normalbereichsproben findet sich weiter unten.

Patientengruppe	#	Positiv Celiac DGP Screen	(%)
Zöliakie	85	81	95,3%
Zöliakie IgA-Mangel	50	50	100%
Zöliakie auf, Glutenfreie Diät	33	9	27%
Verwandte 1. Grades	18	2*	11%
Dermatitis Herpetiformis Patienten	65	59**	91%
IgA-Mangel Kontrollen	36	0	0%
Nicht- Zöliakie Krankheit Patienten	81	1	1,2%
Normals	517	4***	0,8%

*Einer der Verwandten wies 41,3 Einheiten auf und war sowohl h-tTG- als auch EMA-positiv. Der zweite Verwandte wies 20,2 Einheiten auf und war sowohl h-tTG- als auch EMA-negativ.

**In derselben Patientengruppe waren nur 54 oder 83% h-tTG-positiv, und 6 dieser 65 Personen wiesen infolge der Biopsie keine Veränderungen der Darmschleimhaut auf (Marsh-Typ 0).

***Von diesen 4 Proben lag eine bei 20,1 Einheiten und eine andere bei 20,2 Einheiten. Der Cutoff-Wert wurde auf 20 Einheiten festgelegt. Eine weitere dieser 4 Proben lag bei 25,4 Einheiten, war außerdem stark h-tTG-positiv und könnte deshalb tatsächlich auf eine Zöliakie schließen lassen.

Zöliakie DGP Screen- und ELISA-Testergebnisse in Bezug auf die Zöliakiediagnose:

		Diagnos		
		Positiv	Negativ (Krankheit-Kontrollen und Gesund-Kontrollen)	Gesamtmenge
QUANTA LITE™ DGP Screen	Positiv	131	5	136
	Negativ	4	629	633
	Gesamtmenge	135	634	769

Sensitivität: 97% (131/135)

Spezifität: 99,2% (629/634)

Sensitivität – Die Gesamtsensitivität des Tests für Zöliakie wird durch Zusammenfassung der Testergebnisse der 85 Zöliakiepatienten und der 50 IgA-defizienten Zöliakiepatienten berechnet. Damit ergibt sich eine Gesamtanzahl von 135 Zöliakiepatienten, von denen 131 bzw. 97% positiv sind.

Spezifität – Die Spezifität des Tests kann durch Zusammenfassung der 517 Normalproben (einschließlich der htTG-positiven Probe), der 81 Nicht-Zöliakie-Kontrollen und der 36 IgA-defizienten Kontrollen berechnet werden. Insgesamt umfasst diese Gruppe also 634 Proben. Davon waren nur 5 Proben positiv, was eine Spezifität von 99,2% ergab.

Kreuzreaktivität

Eine Vielzahl hochtitriger, Autoantikörper-positiver Proben wurde zur Bewertung potenzieller Kreuzreaktivität mit anderen Autoantikörpern mit dem QUANTA Lite™ Celiac DGP Screen Kit getestet. Insgesamt wurden 86 Proben untersucht. Viele dieser Proben waren stark positive Kontrollen von anderen INOVA QUANTA Lite™ Autoantikörper-Testkits. Spezifität: Centromer (4), Aktin (4), Sm (9), SS-A (12), RNP (9), Jo-1 (9), SS-B (8), Scl-70 (8), GBM (4), MPO (6), RF (5), Ribo P (4) und M2 (4). Der Mittelwert dieser 86 Proben betrug 2,40 Einheiten. Alle diese Proben waren mit dem QUANTA Lite™ Celiac DGP Screen negativ. Der Mittelwert war 8 Standardabweichungen unter dem Cutoff-Wert von 20 Einheiten.

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Intra-Assay-Leistung für QUANTA Lite™ Celiac DGP Screen wurde durch Testen von 13 Proben mit je insgesamt 5 Testdurchläufen bewertet. Die Ergebnisse sind unten dargestellt.

Intra-Assay-Leistung von QUANTA Lite™ Celiac DGP Screen ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Durchschnittseinheiten	57,5	51,8	102,0	27,5	121,0	162,0	7,9	4,6	5,3	17,7	25,0	17,4	23,4
Standardabweichung	0,3	1,4	0,9	0,4	1,3	2,8	0,4	0,2	0,1	0,4	0,7	0,4	0,7
Variationskoeffizient %	0,5	2,7	0,9	1,6	1,1	1,7	4,7	4,1	2,6	2,2	2,8	2,2	2,8

Die Inter-Assay-Abweichung wurde durch Testen (im Doppelansatz) eines Panels aus 8 Proben und der stark positiven Kit-Kontrolle (HPC) zweimal täglich (einmal morgens und einmal nachmittags) über 3 Tage bewertet. Eine Zusammenfassung der Studienergebnisse finden Sie weiter unten.

Inter-Assay-Leistung von QUANTA Lite™ Celiac DGP Screen ELISA

	HPC	A	B	C	D	E	F	G	H
Durchschnittseinheiten	110,4	54,6	48,5	27,5	157,9	9,8	16,4	22,2	18,8
Standardabweichung	3,4	1,4	1,9	1,0	3,8	0,6	0,1	0,7	0,6
Variationskoeffizient %	3,0	2,5	3,8	3,6	2,4	5,8	4,7	3,2	3,4

Referenzen

1. Trier JS: Celiac Sprue. New England Journal of Medicine 325: 1709-1719, 1991.
2. Troncone R and Ferguson A: Antigliadin antibodies. J Pediatr Gastroenterol Nutr 12: 150-158, 1991.
3. McMillan SA, Haughton DJ, et al.: Predictive value for coeliac disease of antibodies to gliadin, endomysium and jejunum in patients attending for jejunal biopsy. BMJ 303: 1163-1165, 1991.
4. Lindh E, Ljunghall S, et al.: Screening for antibodies against gliadin in patients with osteoporosis. Journal of Internal Medicine 241: 403-506, 1992.
5. Burgin-Wolff A, Gaze H, et al.: Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. Arch Dis Child 66: 941-947, 1991.
6. Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Arch Dis Child 65: 909-911, 1990.
7. Osman AA, et al.: B-Cell epitopes of gliadin. Clin Exp Immunol 121: 248-254, 2000.
8. Aleanzi M, et al.: Celiac disease: Antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. Clinical Chemistry 47: 2023-2028, 2001.
9. Schwertz E, et al.: Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. Clinical Chemistry 50: 2370-2375, 2004.
10. Prince HE: Evaluations of the INOVA Diagnostics Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Measuring Serum Immunoglobulins G (IgG) and IgA to Deamidated Gliadin Peptides. Clinical and Vaccine Immunology 13: 150-151, 2006.
11. Sugai E, et al.: Accuracy of Testing Antibodies to Synthetic Gliadin-Related Peptides in Celiac Disease. Clinical Gastroenterology and Hepatology 4: 1112-1117, 2006.
12. Collin P, et al.: Selective IgA deficiency and coeliac disease. Scand Journal Gastroenterology 27: 367-371, 1992.
13. Stober W: Gluten-sensitive enteropathy: A nonallergic immune hypersensitivity of the gastrointestinal tract. J. Allergy Clin. Immunol. July 202-211, 1986.
14. Smecuol E, et al.: Permeability, Zonulin Production, and Enteropathy in Dermatitis Herpetiformis. Clinical Gastroenterology and Hepatology 3: 335-341, 2005.
15. Beutner EH, et al.: Sensitivity and Specificity of IgA-class antiendomysial antibodies for dermatitis herpetiformis and findings relevant to their pathogenic significance. Journal of the American Academy of Dermatology 15: 464-473, 1986.
16. Porter WM, et al.: Tissue Transglutaminase Antibodies in Dermatitis Herpetiformis – Correspondence. Gastroenterology 117: 749-750, 1999.
17. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, Fifth Edition, 2007.
18. CLSI (NCCLS). Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document H18-A3, Vol 24(38), 2004.
19. CLSI (NCCLS). Statistical quality control: Principles and definitions; Approved Guideline- 2nd edition NCCLS Document C24-A2, Vol. 19(5), 2006.

Hersteller:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Autorisierter Repräsentant:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

Technical Service
624545DEU

888-545-9495
October 2008
Revision 2

