

Nur für "In-Vitro Diagnostik"

CLIA Kompliziertheit: Hoch

Verwendungszweck

QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile ist ein fluoreszenter Immunoassay für den semiquantitativen Nachweis von IgA-Anti-humane Gewebettransglutaminase (h-tTG) und Anti-desamidierter Gliadin-Peptid (DGP)-Antikörper und der Nachweis einer unzureichenden IgA-Menge in menschlichem Serum. Der Nachweis dieser Antikörper ist in Verbindung mit anderen Laborbefunden und klinischen Befunden bei der Diagnose der glutensensitiven Enteropathie Zöliakie hilfreich. Eine unzureichende IgA-Menge weist darauf hin, dass nicht genügend IgA für den Nachweis von IgA-Anti-h-tTG oder Anti-DGP vorhanden ist.

Informationen zum Test

Zöliakie ist eine chronische Erkrankung, zu deren Hauptmerkmalen eine Entzündung und typische „Abflachung“ der Darmschleimhaut zählen, die zu einem Malabsorptionssyndrom führen, das als glutensensitive Enteropathie bezeichnet wird. Die genaue Ätiologie der Erkrankung ist zwar nach wie vor unbekannt, Gliadin, die alkohollösliche Fraktion des Weizenglutens, ist jedoch eindeutig das Toxikon.^{1,2}

Ursprünglich wurde zur Diagnose von Zöliakie eine Reihe von Darmbiopsien eingesetzt. In letzter Zeit wurden serologische Tests für den Nachweis von Anti-Gliadin-, Anti-Endomysium- sowie Anti-tTG-Antikörpern zum Screening von Patienten mit Verdacht auf glutensensitive Enteropathie sowie zur Überwachung von Diätbefolgung empfohlen.³⁻⁵ Die European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition hat den Einsatz von Antikörpermarkern wie Anti-Gliadin- und Anti-Endomysium-Antikörpern empfohlen, um die Anzahl der für eine Diagnose erforderlichen Darmbiopsien zu reduzieren.⁵

Das endomysiale Antigen wurde als das Proteinvernetzungsenzym tTG.⁶ Spezifische ELISA-Verfahren mit tTG als Antigen bieten eine verlässliche und objektive Alternative zu herkömmlichen Immunfluoreszenztests mit dünnen Gewebeschnitten aus Affenösophagus als Substrat.⁶⁻⁸ Das h-tTG-Antigen wurde mittels Rekombinationstechnologie hergestellt und kann im Vergleich zum herkömmlichen Meerschweinchenleber-Antigen bestimmte Vorteile aufweisen.^{7,8}

Kürzliche Studien haben ergeben, dass gliadinreaktive Antikörper von Zöliakie-Patienten eine sehr beschränkte Anzahl spezifischer Epitope auf dem Gliadin-Molekül binden.⁹⁻¹¹ Mit diesen Studien lässt sich zudem nachweisen, dass die selektive Desamidierung von Gliadin durch das Zöliakie-assoziierte Enzym tTG eine verstärkte Bindung an Anti-Gliadin-Antikörper zur Folge hat. Assays, die desamidierte Gliadinpeptide verwenden, weisen eine höhere diagnostische Genauigkeit für Zöliakie als herkömmliche Anti-Gliadin-Assays und sogar Anti-tTG-Assays auf.^{12,13} Zudem sind diese Antikörper für die Verfolgung der Krankheitsaktivität im Laufe der Zeit sowie zur Überwachung der Einhaltung einer glutenfreien Diät interessant.¹³

Ein signifikanter Anteil der Zöliakie-Patienten weist einen IgA-Mangel auf.¹⁴⁻¹⁷ Ein sensitives Screening-Verfahren für Risikopopulationen umfasst daher Testen auf IgA-Anti-DGP- und Anti-h-tTG-Antikörper sowie Testen auf einen selektiven IgA-Mangel.

Dermatitis herpetiformis (DH) ist eine Hautkrankheit, die wie 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 Hautläsionen.^{1,2,18} Gängige serologische Diagnostiktests, wie Endomysium-, native Gliadin- und tTG-Assays, führen beim Testen auf DH zu schwachen Ergebnissen. Die Sensitivität dieser Assays liegt bei nur 60-75%¹⁸ im Vergleich zu einer über 95%igen Sensitivität bei Zöliakie.³⁻⁸

Der QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile ist ein Screening-Test für den Nachweis von Antikörpern, die bei Personen mit Zöliakie und der damit verbundenen glutensensitiven Erkrankung Dermatitis herpetiformis vorzufinden sind. Er ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis von IgA-Antikörpern gegen ein synthetisches desamidiertes Gliadinpeptid wie auch rekombinante humane tTG und weist zugleich einen IgA-Mangel nach.

Testprinzip

Rekombinante h-tTG und synthetisches DGP werden jeweils an verschiedene, fluoreszenzgefärbte Beads gebunden. Die zwei verschiedenen antigenbeschichteten Beads sowie ein Anti-IgA-beschichtetes Kontrollbead und ein IgA-beschichtetes Kontrollbead werden vermischt und unter Bedingungen, welche die Antigene in ihrem reaktiven Zustand erhalten, in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Die vorverdünnten Kontrollen, eine serumfreie Kontrolle aus einem Probenverdünner ohne Serumzugabe und die verdünnten Patientenproben werden in separate Vertiefungen gegeben, damit vorhandene DGP- und h-tTG-Antikörper an die immobilisierten Antigene auf den Beads sowie freie IgA an das Anti-IgA-Bead binden können. Hierauf wird jeder Vertiefung ein an eine Fluoreszenzsonde konjugiertes Anti-Human-IgA hinzugefügt. Eine zweite Inkubation lässt das fluoreszierende Anti-Human-IgA-Konjugat an Patientenantikörper, die sich an die Antigene auf den Beads angeheftet haben oder von dem Anti-IgA-Bead eingefangen wurden, sowie an das IgA auf dem IgA-Bead binden. Die Proben werden hierauf im Luminex™ 100 oder 200 Durchflussmesser gemessen. Dieser Durchflussmesser ist imstande, die Farben der einzelnen Beads zu unterscheiden sowie die Fluoreszenzintensität des Konjugats auf jedem Bead zu messen.¹⁹ Die Fluoreszenzintensität auf dem Bead ist proportional zur gebundenen Konjugatmenge, die wiederum proportional zur Menge der Patientenantikörper ist, die an die antigenbeschichteten Beads oder das Anti-IgA-Bead gebunden sind. Jeder Antikörper kann anhand des Vergleichs der Fluoreszenzintensität der Patientenprobe mit jener des entsprechenden Kalibrators semiquantifiziert werden. Mittels Vergleich der berechneten Luminex-Einheiten des Anti-IgA-Beads und IgA-Beads kann ein selektiver IgA-Mangel, wie in der Folge unter „Interpretation der Ergebnisse“ erläutert, identifiziert werden. Diese beiden Kontrollbeads können auch verwendet werden um sicherzustellen, dass falsch negative Ergebnisse aufgrund von

Verfahrensfehlern, wie in der „Qualitätskontrolle“ erläutert, erkannt werden. Bitte beachten Sie, dass diese Beads dasselbe Ergebnis bei einer Person mit IgA-Mangel und wenn der Vertiefung kein Serum hinzugefügt wird, liefern.

Inhalt der Testpackung

1. Polystyren-Microwellplatte, 12 (1x8) Microwellstreifen (geprägtes Silber in der Farbe) mit Halter, in dem sich Beads in 4 verschiedenen "Farben" befinden. Jedes der farbigen Beads ist mit einem anderen gereinigten Antigen (h-tTG, DGP, anti-IgA oder IgA) überzogen, in einer Folienverpackung mit Trockenmittel
2. QUANTA Plex™ Negative Control, 1 Fläschchen Puffer mit Konservierungsmittel und Humanserum ohne humane IgA Antikörper gegen h-tTG und DGP Antigene im, vorverdünnt, gebrauchsfertig, 1,2 mL
3. Celiac IgA Calibrator, 1 Fläschchen Puffer mit Konservierungsmittel und Humanserum-IgA Antikörpern gegen h-tTG und DGP Antigenes, vorverdünnt, gebrauchsfertig, 1,2 mL
4. Celiac IgA Positive Control, 1 Fläschchen Puffer mit Konservierungsmittel und Humanserum-IgA Antikörpern gegen h-tTG und DGP Antigenes, vorverdünnt, gebrauchsfertig, 1,2 mL
5. HRP Probenverdünner, 1 rosafarbiges Fläschchen mit TBS (Tris buffered saline), Tween 20, Proteinstabilisatoren und Konservierungsmitteln, 50 mL (auch als serumfreie Kontrolle verwendet)
6. Fluoreszent markiertes IgA Konjugat Ziege Antihuman IgA (Alphaketten-spezifisch), 1 Bernsteinfläschchen lyophilisiertes Pulver mit Puffer, Proteinstabilisatoren und Konservierungsstoffen Siehe Anwendungsmethoden für Anweisungen zur Wiederherstellung
7. QUANTA Plex™ Conjugate Diluent, 1 rosafarbiges Fläschchen mit Puffer, Proteinstabilisatoren und Konservierungsmitteln, 7mL

Hinweise

1. VORSICHT: HRP Probenverdünner 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.²⁰
3. Na₃ wird als Stabilisator verwendet. Na₃ 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. Die vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung während der Arbeit mit Reagenzien tragen.
5. 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. Alle Kontrollen sind Kit- Losnummern-spezifisch.
3. 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.
4. Eine Reihe von Faktoren beeinflussen den Assayvorgang, wie etwa Starttemperatur der Reagenzien, Temperatur der Umgebung, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Pipettierungstechnik, Reproduzierbarkeit der Mischtechnik, der Luminex™ 100 or 200 Durchfluss- analysator, der für die Messung der Ergebnisse und der Inkubationszeiten während des Assays verwendet wird. Es muss genau auf die Konsistenz geachtet werden, um exakte und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.
5. Die strikte Einhaltung der Testprozedur wird empfohlen. Jede Änderung im Protokoll erfolgt auf Risiko des Anwenders.
6. Das unvollständige Verschließen der Mikrotiterkavitäten und des Trockenmittels führt zu Antigenabbau und schlechter Präzision.
7. Inakzeptabel niedrige Fluoreszenz kann eventuell nach mehrmaligem Gebrauch derselben Flasche eines fluoreszenten Konjugats innerhalb eines bestimmten Zeitraums beobachtet werden. Die Gebrauchsanleitungen für fluoreszentes Konjugat sollten daher genauestens befolgt werden, um dies zu verhindern.
8. Chemische Verunreinigung des fluoreszenten Konjugats kann aus unsachgemäßer Reinigung oder Ausspülung der Geräte oder Instrumente resultieren. Rückstände aus gängigen Laborchemikalien wie Formalin, Bleiche, Ethanol oder Detergens führen allmählich zu Degradierung des fluoreszenten Konjugats. Geräte und Instrumente daher nach dem Gebrauch chemischer Reiniger/Desinfektionsmittel gründlich mit destilliertem oder deionisiertem Wasser ausspülen.

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.

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 (früher 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.

Testdurchführung

In der Testpackung vorhandenes Material

- 1 Celiac IgA Profile Mikrotiterplatte, (12-1 x 8 Kavitäten), gestempeltes Silber in der Farbe mit Streifenhalter
- 1 1,2 mL vorverdünnte (gebrauchsfertig) QUANTA Plex™ Negative Control
- 1 1,2 mL vorverdünnte (gebrauchsfertig) Celiac IgA Calibrator
- 1 1,2 mL vorverdünnte (gebrauchsfertig,) Celiac IgA Positive Control
- 1 50 mL HRP Probenverdünner (auch als serumfreie Kontrolle verwendet)
- 1 Fluoreszent markiertes Konjugat (Ziege), Antihuman IgA
- 1 7 mL QUANTA Plex Conjugate Diluent

Zusätzliches benötigtes Material

- Pipetten für 5 und 500 µL
- Einmal-Pipettenspitzen
- Eppendorf-Reaktionsgefäße für die Serumverdünnung, 1-4 mL Volumen
- Distilliertes oder deionisiertes Wasser
- Trägerflüssigkeit (Sheath Fluid) für das Luminex™ 100 oder 200 Durchfluss-Analysator
- Luminex™ 100 or 200 Durchfluss-Analysator
- Elektronische 8-Kanal-Pipette für 5, 30, 45, 50 und 60 µL oder Pipettierautomat/Verdünner

GEBRAUCH DES LUMINEX™ 100 oder 200 DURCHFLUSS-Analysator

1. Folgen Sie den Anweisungen des User-Handbuches des Luminex™ für detaillierte Anweisungen für die Bedienung der Luminex™ 100 oder 200 Integrated System (IS) Version 2,0 oder höherer Software Programm. Für weitere Informationen und Fragen bei Problemen mit diesem Test wenden Sie sich bitte an den Kundendienst von INOVA Diagnostics, Inc. unter der auf der letzten Seite des Handbuchs angegebenen Adresse oder Telefonnummer. Eine kurze Bedienungsanleitung für das Luminex™ 100 oder 200 Durchfluss-Analysator.
2. Kalibrieren Sie das Luminex™ mit Hilfe der Kalibrations und kontrollbeads, die von Luminex Corporation mindestens einmal monatlich geliefert werden, und vergewissern Sie sich, dass die Kalibration erfolgreich verlaufen ist. Kalibrieren Sie das Luminex™ ebenfalls, wenn die Delta-Kalibrationstemperatur mehr als 3 Grad beträgt, wenn die Test-Kontrollen außerhalb des zulässigen Bereichs sind oder je nach Bedarf.
3. Das Luminex™ benötigt 30 Minuten Aufwärmzeit nach dem Einschalten des Gerätes. Nach Ende der Aufwärmzeit führen Sie den Prime-, Alkoholspülungs- und Waschvorgang aus wie vom Hersteller empfohlen.
4. Benützung der IS Version Software, laden Sie das „QP Celiac IgA Profile“ Template und vergewissern Sie sich, dass die Losinformation korrekt ist. Aktualisieren Sie bei Bedarf die Losinformation. Die Template-Parameter sind folgende: Die Beadfarben sind h-tTG = 27, DGP = 28, anti-IgA = 29, IgA = 30. Die Ereignisse pro Bead sind 50, die Probengröße ist 50 µl, die Durchflussrate ist 60 µl/Minute (schnell) und das Gate ist. 7500 bis 17000. Die Medianwerte werden für die Median Fluorescent Intensity (MFI) benützt.
5. Geben Sie die Probenamen entweder manuell durch Klicken auf „Load Pa List“.
6. Laden Sie die Platte auf die XY Plattform des Luminex™.
7. Nehmen Sie das Luminex™ in Betrieb indem Sie auf den „Start Plate“ –Knopf.
8. Wenn Sie das Gerät für den Rest des Tages nicht mehr benötigen, schalten Sie es ab, und führen Sie anschließend den Desinfizierungs- und Reinigungsvorgang durch.

Methode:

Testvorbereitung

1. Für Programmierinformationen für automatisiertes Equipment wenden Sie sich bitte an den Kundendienst von INOVA Diagnostics, Inc.
2. Schalten Sie das Luminex™ 100 oder 200 Durchfluss-Analysator ein, stellen Sie sicher, dass es aufgewärmt ist, und führen Sie anschließend alle täglichen Wartungsvorgänge wie oben beschrieben durch. Wenn nötig, kalibrieren Sie das Instrument und vergewissern Sie sich, dass die Kalibration erfolgreich verlaufen ist.
3. Bringen Sie alle Reagenzien und Patientenproben auf Raumtemperatur (20-26°C) und mischen Sie diese gut durch.
4. Falls das Antihuman IgA fluoreszente Konjugat nicht wiederhergestellt wurde, fügen Sie 6 mL QUANTA Plex™ Conjugate Diluent dem Bernsteinfläschchen bei, welches das lyophilisierte Pulver enthält und schütteln Sie es ca. 30 Sekunden, um den Inhalt aufzulösen. Das wiederhergestellte fluoreszente Konjugat hält drei Monate bei 2-8°C. **Nicht einfrieren!**
5. Stellen Sie sicher, dass der Trägerflüssigkeitsbehälter im Luminex™ mit Trägerflüssigkeit von Luminex Corporation gefüllt ist und dass die Abfallflasche leer ist.
6. Bereiten Sie eine 1:101 Verdünnung jeder Patientenprobe durch die Zugabe von 5 µL jedes Serums in 500 µL HRP Probenverdünnungsmittel vor, dann die Lösung durch Schütteln gründlich mischen.

Verdünnte Proben müssen innerhalb von 8 Stunden nach dem Zeitpunkt der Herstellung verbraucht werden. QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Calibrator und Positive Control schwach und stark positiv **NICHT VERDÜNNEN!**

7. Für die Bestimmung von Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von IgA anti-h-tTG und anti-DGP-Antikörpern anhand des Gebrauchs von willkürlichen Einheiten werden je ein und für den Nachweis von selektivem IgA-Mangel werden zwei Vertiefungen für die Kalibratorkontrolle sowie je eine Vertiefung für die negative, positive und serumfreie Kontrolle benötigt. Es wird empfohlen, die Proben in einelementiger Menge laufen zu lassen.

Testdurchführung

1. **Alle Reagenzien müssen vor dem Start des Tests auf Raumtemperatur (20-26°C) gebracht werden.** Geben Sie die benötigte Anzahl an Microwells/Streifen in den Halter. **Geben Sie unbenutzte Streifen sofort in den Antikondensationsbeutel zurück und verschließen Sie diesen fest, um Wasserdampf- und Lichteinwirkung zu minimieren.**
2. Geben Sie 45 µL HRP-Probenverdünner in jede Vertiefung mit einer **Patientenprobe (und der serumfreien Kontrolle)**. Geben Sie **keinen** HRP-Probenverdünner in die ersten vier Vertiefungen mit der QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Calibrator (doppelt) und Celiac IgA Positive Control. Geben Sie die verdünnten Patientenproben zu diesem Zeitpunkt **nicht** auf die Microwells.
3. Halten Sie einen der folgenden Zeitabstände bei der Zugabe von Kontrollen, Proben und Konjugat zu den Microwells ein. Da die Proben in einem Intervall von ca. 1 Probe je 19 Sekunden (oder ein 8-Well-Streifen in ca. 2½ Minuten) mit dem Luminex™ abgelesen werden, müssen die Patientenproben sowie das Konjugat den Microwells in diesem Intervall beigegeben werden, um jegliche Front-to-Back Assay Variation zu minimieren. Wenn Kontrollen, Proben oder Konjugat nacheinander beigegeben werden, staffeln Sie jede dieser Beigaben zum nächsten Microwell im Abstand von 19 Sekunden. Wenn Kontrollen, Proben oder Konjugat jeweils zu acht auf einen Streifen gegeben werden, staffeln Sie jede dieser Beigaben auf den nächsten Streifen im Abstand von 2½ Minuten. Jedes dieser Zeitmodelle benötigt etwa 30 Minuten für die Beigabe der Proben auf alle 12 Streifen einer ganzen Platte und minimiert Front-to-Back Assay Variation.
4. Vortexen Sie und geben Sie dann jeweils 50 µL folgender **vorverdünnter** Kontrollen hinzu: QUANTA Plex™ Negative Control in die erste Vertiefung, Celiac IgA Calibrator in die zweite und dritte Vertiefung sowie Celiac IgA Positive Control in die vierte Vertiefung. Bei manueller Beigabe der Proben und Mischen der Beads muss eine elektronische Pipette benützt werden. Verwenden Sie einen der beiden Zeitabstände wie in Punkt 3 beschrieben. **Pipettieren Sie mindestens 30 µL der QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Calibrator und -Positive Control 4x kräftig auf und ab, um die Beads und Kontrollen in jeder Vertiefung zu vermischen.** Die 30minütige Inkubationszeit beginnt nach Zugabe der QUANTA Plex™ Negative Control in das **erste** Microwell.
5. Machen Sie sofort mit dem Test weiter, indem Sie 5 µL HRP-Probenverdünner in die fünfte Vertiefung (serumfreie Kontrolle) und 5 µL verdünntes Patientenserum in die entsprechenden restlich Vertiefungen hinzugeben. (bitte beachten: hieraus ergibt sich eine 1:1010 Endverdünnung des Patientensersums). Halten Sie denselben Zeitabstand wie bei Punkt 4 ein. **Mischen Sie die verdünnte Patientenprobe und die HRP Probenverdünnung im Microwell durch kräftiges 4maliges Auf-und-Ab-Pipettieren von mindestens 30 µL des Inhalts des Microwells.** Fahren Sie fort, indem Sie die Inkubation ab dem Zeitpunkt der Zugabe der QUANTA Plex™ Negative Control auf 30 Minuten begrenzen. Legen Sie die Microwell- Streifen für die restliche Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf eine glatte Oberfläche, geschützt vor direktem Sonnenlicht.
6. Nach Ende der ersten Inkubationsperiode fügen Sie jedem Microwell 50 µL fluoreszentes Konjugat bei und pipettieren Sie mindestens 60 µL des Inhalts des Microwells kräftig viermal auf und ab. Halten Sie für die Beigabe des Konjugats denselben Zeitabstand wie bei Punkt 4 und 5 ein. Das Konjugat sollte der Flasche unter standardmäßigen sterilen Bedingungen und mit guter Labortechnik entnommen werden. Entnehmen Sie der Flasche nur die Menge an Konjugat, die Sie für den Test benötigen. **Um eventuelle mikrobiische und/oder chemische Verunreinigung zu vermeiden, füllen Sie niemals unbenutztes Konjugat in die Flasche zurück!** Halten Sie für die Microwell-Streifen eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur auf glatter Oberfläche und vor direktem Sonnenlicht geschützt, ein. Die Inkubationszeit beginnt nach der **ersten** Konjugatbeigabe.
7. Innerhalb einer Stunde nach Ende der 30minütigen Inkubation des fluoreszenten Konjugats lesen Sie die Celiac IgA Profile-Platte auf dem Luminex™, wie unter „Gebrauch des Luminex™ 100 oder 200 Durchfluss-Analysator“ beschrieben, ab.

Qualitätskontrolle

1. Die Celiac IgA Calibrator (doppelt), die Celiac IgA Positive Control, QUANTA Plex™ Negative Control und serumfreie Kontrolle müssen mit jeder Probencharge getestet werden, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien und Verfahren ordnungsgemäß durchgeführt wurden.
2. Beachten Sie bitte, dass die Celiac IgA Calibrator, Celiac IgA Positive Control und QUANTA Plex™ Negative Control nicht als Kontrollen für Verfahrensmethoden hinsichtlich Probenverdünnungen dienen, da sie vorverdünnt sind.
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 ≤-20°C gelagert werden.
4. Die Testergebnisse gelten als gültig, wenn alle unten aufgelisteten Kriterien erfüllt wurden. Wurde eines dieser Kriterien nicht erfüllt, so muss der Test als ungültig angesehen und wiederholt werden. Der Wert in Luminex-Einheiten (LE) des Kalibrators für jedes Antigen ist auf dem Packungsetikett des betreffenden Kits zu finden. Siehe Formel im Abschnitt „Ergebnisberechnung“ zur Bestimmung der LE der QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Positive Control, sowie der serumfreien Kontrolle.

- a. Der Wert der QUANTA Plex™ Negative Control muss für h-tTG und DGP < 20 LE betragen. Er muss für die IgA- sowie Anti-IgA-Kontrollbeads zwischen 10 und 40 LE liegen.
 - b. Der Wert der Celiac IgA Positive Control muss für h-tTG und zwischen 30 LE und 130 LE für DGP \geq 30 LE betragen. Er muss für die IgA- sowie Anti-IgA-Kontrollbeads zwischen 10 und 40 LE liegen.
 - c. Der Wert der Serumfreien Kontrolle muss für h-tTG und DGP < 20 LE betragen. Für das Anti-IgA-Bead muss der Wert < 5,0 LE und für das IgA-bead zwischen 10 und 40 LE liegen.
 - d. Das Verhältnis der LE für Anti-IgA/IgA muss >0,50 für die QUANTA Plex™ Negative Control und Celiac IgA- Positive Control und <0,50 für die serumfreie Kontrolle betragen.
 - e. Die Anti-IgA- und IgA-Kontrollbeads dienen dazu, selektiven IgA-Mangel nachzuweisen und sicherzustellen, dass falsch negative Patientenergebnisse aufgrund von Verfahrensfehlern erkannt werden. Wenn eines der beiden Kontrollbeads ein berechnetes Ergebnis von unter 5 LE für einen bestimmten Patienten liefert, so erscheint ab Version IS 2,0 das Ergebnis „Test wiederholen“.
 - i. Es besteht die Möglichkeit, dass der Patient selektiven IgA-Mangel hat, wenn die Ergebnisse für Anti-h-tTG und DGP negativ sind (also unter 20 LE) und das Anti-IgA-Bead unter 5 LE liegt, während gleichzeitig der Wert des IgA-Kontrollbeads über 20 LE liegt, was ein Verhältnis von Anti-IgA LE/IgA LE <0,5 ergibt. Hinweis: dieses Ergebnis kann auch vorliegen, wenn der Vertiefung kein Patientenserum hinzugefügt wurde.
 - ii. Wenn sowohl das Anti-IgA-Bead als auch IgA-Bead kleiner als 5,0 LE liegen, so wurde der Vertiefung möglicherweise kein Konjugat hinzugefügt. Muss die Probe erneut getestet werden, um das negative Ergebnis zu bestätigen.
5. Die QUANTA Plex Negative Control die Celiac IgA Calibrator und Positive Control und die Serumfreie Kontrolle dienen der Sicherstellung der ordnungsgemäßen Funktionsweise des Testansatzes. Der Anwender sollte unter anderem das CLSI (früher NCCLS) Dokument Nr. C24-A3 für zusätzliche Hinweise zur zeitgemäßen Qualitätskontrolle beachten.

Berechnung der Ergebnisse

Die MFI für alle Kontrollen und Patientenproben für jedes Antigen sowie werden zuerst bestimmt. Die Reaktivität in LE einer bestimmten Probe von jedem Antigentyp kann mittels folgender Formel ermittelt werden. Dividieren Sie den MFI der Probe durch den MFI des Celiac IgA Calibrator für dieses Antigen und multiplizieren Sie das Ergebnis mit der Anzahl der LEs des Celiac IgA Calibrator für dieses Antigen. Die LE wert des Kalibrators für jedes Antigen sind auf dem Packungsetikett der betreffenden Kit. Das folgende Beispiel dient der Bestimmung der Anti-h-tTG-Reaktivität. Verwenden Sie die gleichwertige Formel für das DGP-Bead und die beiden Kontrollbeads.

$$\text{Probenwert (in LE)} = \frac{\text{MFI d. Probe für h-tTG}}{\text{h-tTG Kalibrator MFI}} \times \text{h-tTG Kalibrator Wert (in LE)}$$

Die IgA-Antikörperreaktivität für h-tTG und DGP kann hierauf gemäß Tabelle unten klassifiziert werden

	LE
Negativ	<20
Schwach Positiv	20-30
Positiv	>30

Die Reaktivität steht in Zusammenhang mit der Anzahl der Autoantikörper des Beads in nichtlinearer Weise. Während Zunahme und Abnahme der Antikörperkonzentration des Patienten aus entsprechender Steigerung oder Dezimierung der fluoreszenten Reaktivität ersichtlich sind, verläuft die Umkehrung nicht proportional (d.h. aus einer Verdoppelung der Antikörperkonzentration folgt keine Verdoppelung der Reaktivität). Weiter beeinflusst die Gesamtanzahl aller IgA eines Patientenserums die gemessene MFI. Wird eine genauere Quantifizierung der Autoantikörper des Patienten benötigt, so sollte die Probe einem quantitativen Test unterzogen werden.

Deutung der Ergebnisse

Der QUANTA Plex™ Assay reagiert äußerst sensitiv auf Verfahren und ist imstande, minimale Differenzen bei Patientenkulturen zu orten. Jedes Labor sollte auf Basis seiner eigenen Methoden, Kontrollen, Ausstattung und Patientenbevölkerung gemäß den eigenen bewährten Verfahren seinen eigenen Normalbereich festlegen.

Es wird empfohlen, dem Ergebnisbericht des Labors folgende Erklärung beizufügen: „Folgende Ergebnisse wurden mittels dem INOVA QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile erzielt. Werte, die mittels Testmethoden anderer Hersteller erzielt wurden, sind nicht untereinander austauschbar. Das Ausmaß der angezeigten IgA Autoantikörper-Niveaus kann nicht in allen Fällen mit einem Endpunkttiter korreliert werden.“

Zur Bestimmung, ob der Patient eine ausreichende oder unzureichende Menge an IgA im Serum hat, dividieren Sie die LE des Anti-IgA-Beads durch die LE des IgA-Beads. Liegt das Ergebnis unter 0,5 und ist der Patient sowohl Anti-h-tTG- als auch Anti-DGP-negativ, so sollte die Probe nochmals getestet werden, um das Ergebnis zu bestätigen. Wurde bestätigt, dass der Patient eine unzureichende IgA-Menge aufweist, so sollte die Probe auf IgG-Anti-h-tTG- und IgG-Anti-DGP-Tests reflektiert werden. Ist eine Bestätigung des IgA-Mangels erforderlich, so sollte die Probe mit einem quantitativen IgA-Test getestet werden.

Grenzen des Verfahrens

1. Immunkomplexe oder andere Immunoglobulin-Aggregate im Patientenserum können nicht-

- spezifische Bindungen und falsch-positive Ergebnisse hervorrufen.
2. Nicht alle Zöliakie und Dermatitis Herpetiformis -Patienten sind h-tTG oder DGP IgA Antikörper.
 3. Ergebnisse dieses Testes müssen im Zusammenhang mit klinischen Ergebnissen und anderen serologischen Tests verwendet werden.
 4. Werden die Kontrollen und/oder verdünnten Serumproben nicht ausreichend mit den beads in der Platte gemischt, kann dies zu höheren %C.V. Werten führen als typischerweise im ELISA Test gefunden.
 5. Nach der halbstündigen Inkubation mit dem Fluoreszenzkonjugat, kommt es mit jeder zusätzlichen halbstündigen Inkubation zu einer 10% igen Zunahme der Fluoreszenz.
 6. Die Leistungscharakteristika für andere Untersuchungsmaterialien als Serum wurden nicht bestimmt.
 7. Wird die gleichmäßige und zeitnahe Zugabe der Reagenzien nicht beachtet, kann dies zu höheren Variationen innerhalb des Testlaufs führen.

Erwartungswerte

Die Fähigkeit des QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile-probe für den Nachweis von anti-h-tTG, und anti-DGP -Antikörpern wurde mittels Vergleich zu im Handel erhältlichen ELISA-Tests des Herstellers INOVA Diagnostics Inc. Die Ergebnisse der ELISAs und sowie der einzelnen QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile Tests wurden als positiv bestätigt, wenn die Patientenprobe ≥ 20 Luminex-Einheiten bzw. ELISA-Einheiten war und als negativ, wenn sie < 20 LE oder EE war.

Normalbereich

278 Proben von normalen Blutspendern wurden dem QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile-Test unterzogen. 277 normale Proben (99,6%) fielen negativ für den h-tTG-Anteil des QUANTA Plex™ Tests aus. Die höchste Probe wies einen Wert von 29 LE auf. Der Durchschnittswert betrug 3,2 LE mit einer Standardabweichung (Standard Deviation-SD) von 1,5. Der Cut-Off liegt 11 SD über dem Durchschnitt. Mit Ausnahme von 3 der 278 normalen Proben (98,9%) waren alle negativ für den DGP-Teil des QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile Tests. Die höchste Probe betrug 88 LE. Dieselben Proben lieferte auch beim DGP-ELISA ein positives Ergebnis. Ohne Berücksichtigung der doppelpositiven Probe betrug der Durchschnittswert 4,4 LE mit einer SD von 5,8. Der Cut-Off liegt 2,7 SD über dem Durchschnitt.

Klinische Sensitivität und Spezifität

Zur Bestimmung der klinischen Sensitivität der Autoantikörper-Assays wurden 29 Proben von Patienten mit aktiver Zöliakie und ausreichendem IgA mit dem QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile und den entsprechenden ELISAs getestet. Die klinische Sensitivität für IgA-Anti-h-tTG betrug 93% (mit einem 95%-Konfidenzintervall [KI] von 77-99%). Die klinische Sensitivität für IgA-Anti-DGP betrug 73% (95% KI von 53-92%). Zur Bestimmung der klinischen Spezifität wurden 494 Patienten, bei denen keine Zöliakie diagnostiziert wurde, getestet. Diese Gruppe umfasste normale Blutspender sowie Patienten mit rheumatischen, Leber-, Magen-Darm- sowie Infektionserkrankungen. Die klinische Sensitivität für Anti-h-tTG betrug 98% (95% KI von 96-99%). Die klinische Spezifität für Anti-DGP betrug ebenfalls 98% (95% KI von 96-99%).

Klinische Sensitivität und Spezifität für die IgA-Anti-h-tTG- und DGP-Tests im Celiac IgA Profile

h-tTG IgA		Diagnose		
		Positiv (Zöliakie mit ausreichendem IgA und nicht auf glutenfreier Diät)	Negativ (Kontrollen ohne Zöliakie-Diagnose)	Gesamtmenge
Luminex	Positiv	27	11**	38
	Negativ	2*	483	485
	Gesamtmenge	29	494	523

*Beide dieser Proben waren beim tTg-ELISA negativ. **10 von diesen sind vorher positiv ELISA.
Sensitivität: $27/(27+2) \times 100 = 93,1\%$ ([KI] 77-99%) Spezifität: $483/(11+483) \times 100 = 97,8\%$ ([KI] 96-99%)

DGP IgA		Diagnose		
		Positiv (Zöliakie mit ausreichendem IgA und nicht auf glutenfreier Diät)	Negativ (Kontrollen ohne Zöliakie-Diagnose)	Gesamtmenge
Luminex	Positiv	18	12**	30
	Negativ	11*	482	493
	Gesamtmenge	29	494	523

*10 von diesen sind vorher negativ ELISA. **10 von diesen sind vorher positiv ELISA.
Sensitivität: $18/(18+11) \times 100 = 62,1\%$ ([KI] 53-92%). Spezifität: $482/(12+482) \times 100 = 97,6\%$ ([KI] 96-99%)

Vergleich zwischen QUANTA Plex™ und ELISA-Assays

Die relative positive, negative und Gesamtübereinstimmung in % (mit 95% KI) der QUANTA Plex™ Autoantikörper-Assays im Vergleich zu den ELISAs wurde für alle getesteten Proben berechnet und die Werte sind in der Tabelle unten aufgeführt.

h-tTG IgA		ELISA		
		Positiv	Negativ	Gesamtmenge
Luminex	Positiv	174	2	176
	Negativ	21	757	778
	Gesamtmenge	195	759	954

Positiv prozentuale Übereinstimmung: $174/(174+21) \times 100 = 89,2\%$ (84-93%)
 Negativ prozentuale Übereinstimmung: $757/(2+757) \times 100 = 99,7\%$ (99-100%)
 Gesamtmenge prozentuale Übereinstimmung: $(174+757)/(174+2+21+757) \times 100 = 97,6\%$

DGP IgA		ELISA		
		Positiv	Negativ	Gesamtmenge
Luminex	Positiv	136	4	140
	Negativ	31	783	814
	Gesamtmenge	167	787	954

Positiv prozentuale Übereinstimmung: $136/(136+31) \times 100 = 81,4\%$ (75-87%)
 Negativ prozentuale Übereinstimmung: $783/(4+783) \times 100 = 99,5\%$ (99-100%)
 Gesamtmenge prozentuale Übereinstimmung: $(136+783)/(136+4+31+783) \times 100 = 96,3\%$

Nachweis von unzureichender IgA-Menge

5 Patientenproben mit bekanntem selektivem IgA-Mangel wurden mit dem Celiac IgA Profile getestet, ebenso wie weitere 949 Patienten, wie oben erläutert. Diese 5 plus 21 weitere Patienten erzielten ein Verhältnis bei Anti-IgA-LE/IgA-LE von unter 0,5 und wiesen daher unzureichendes IgA für den Celiac IgA Profile auf.

Sensitivität und Spezifität für das Verhältnis Anti-IgA-LE/IgA LE im QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile

Positive Kontrollen N=5	QUANTA Plex™ Verhältnis >0,5	QUANTA Plex™ Verhältnis <0,5	Klinische Sensitivität QUANTA Plex™ (95% CI)	Alle Negativ Kontrollen N=949	QUANTA Plex™ Verhältnis >0,5	QUANTA Plex™ Verhältnis <0,5	Klinische Specificity QUANTA Plex™ (95% CI)
Anti-IgA/IgA Verhältnis	0	5	100% (82-100%)**	Anti-IgA/IgA Verhältnis	928	21*	99% (98-100%)**

*Basierend auf serologischen Parametern stellten sich 12 von diesen als Zöliakie-Patienten mit IgA-Mangel heraus. 7 waren hochverdünnte Kontrollen und 1 mit bekanntem niedrigem Gesamt-IgA im Serum. Basierend auf einer Inzidenz von 1 in 500 IgA unzulänglich, würde man sich 2 weitere positive Proben gemäß Inzidenz erwarten rate.

**Berechnungen basieren auf 18 erwarteten Mangelproben.

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay und Inter-Assay Variation Für die Intra-Assay-Variation wurden 18 Proben je 10 x mit einem Einzel-Assay getestet. Die Variation bei 3 - 5 repräsentativen Proben für jeden Test ist in der Tabelle unten aufgeführt. Für die Inter-Assay-Variation wurden 20 Proben mit 6 Tests an 6 verschiedenen Tagen getestet. Die Variation bei 3 - 5 repräsentativen Proben für jeden Test ist in der Tabelle unten aufgeführt.

Intra-Assay-Variation			Inter-Assay-Variation		
Antigen	Durchschnitt LE	% C.V.	Antigen	Durchschnitt LE	% C.V.
h-tTG	22	6%	h-tTG	23	9%
h-tTG	23	7%	h-tTG	26	8%
h-tTG	31	7%	h-tTG	31	8%
h-tTG	89	9%	h-tTG	102	3%
h-tTG	255	4%	h-tTG	263	3%
DGP	17	12%	DGP	19	4%
DGP	22	8%	DGP	23	11%
DGP	25	8%	DGP	26	5%
DGP	59	4%	DGP	65	9%
DGP	38	8%	DGP	44	9%
anti-IgA	5	5%	anti-IgA	5	8%
anti-IgA	11	4%	anti-IgA	11	5%
anti-IgA	20	2%	anti-IgA	20	5%
IgA	27	5%	IgA	28	4%
IgA	10	4%	IgA	10	5%
IgA	21	2%	IgA	23	4%

Referenzen

1. Trier JS: Celiac Sprue: N Engl J Med 325: 1709-1719, 1991.
2. Strober W: Gluten-sensitive enteropathy: A nonallergic immune hypersensitivity of the gastrointestinal tract. J. Allergy Clin. Immunol. 78: 202-211, 1986.
3. McMillan SA, Haughton DJ, Biggart JD, 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. Valdimarsson T, Franzen L, Grodzinsky E, et al.: Is small bowel biopsy necessary in adults with suspected celiac disease and IgA anti-endomysial antibodies? 100% positive predictive value for celiac disease in adults. Digestive Diseases and Science 41: 83-87, 1996.
5. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, et al.: Revised criteria for diagnosis of celiac disease: Report of working group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN). Arch Diseases of Childhood 65: 909-911, 1990.
6. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al.: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nature Medicine 3: 797-801, 1997.
7. Sardy M, Odenthal U, Karpatis S, et al.: Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. Clin Chem 45: 2142, 1999.
8. Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, et al.: Human recombinant tissue transglutaminase ELISA : an innovative diagnostic assay for celiac disease. Am J Gastroenterology 95: 1253-1257, 2000.
9. Osman AA, Günnel T, Dietl A, et al.: B-Cell epitopes of gliadin. Clin Exp Immunol 121: 248-254, 2000.
10. Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, et al.: Celiac disease: Antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. Clin Chem 47: 2023-2028, 2001.
11. Schwertz E, Kahlenberg F, Sack U, et al.: Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. Clin Chem 50: 2370-2375, 2004.
12. Prince HE: Evaluation of the INOVA Diagnostics enzyme-linked immunosorbent assay kits for measuring serum immunoglobulin G (IgG) and IgA to deamidated gliadin peptides. Clin Vaccine Immunol 13: 150-151, 2006.
13. Sugai E, Vazquez H, Nachman F, et al.: Accuracy of testing for antibodies to synthetic gliadin-related peptides in celiac disease. Clin Gastroenterol Hepatol 4: 1112-1117, 2006.
14. Collin P, Maki M, Keyrilainen O, et al.: Selective IgA deficiency and celiac disease. Scand J Gastroenterol 27: 367-371, 1992.
15. Cataldo F, Marino V, Ventura A, et al.: Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Gut 42: 362-365, 1998.
16. Fernandez E, Blanco C, Garcia S, et al.: Use of low concentrations of human IgA anti-tissue transglutaminase to rule out selective IgA deficiency in patients with suspected celiac disease. Clin Chem 51: 1014-1016, 2005.
17. Dahlbom I, Olsson M, Forooz NK, et al.: Immunoglobulin G (IgG) anti-tissue transglutaminase antibodies used as markers for IgA-deficient celiac disease patients. Clin Diag Lab Immunol 12: 254-258, 2005.
18. Chorzeliski TP, Sulej J, Tcherzewska H, et al.: IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and celiac disease. Ann NY Acad Sci 420: 325-334, 1983.
19. Martins TB, Burlingame R, von Mühlen CA, et al.: Evaluation of multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens. Clin Diagn Lab Immunol 11: 1054-1059, 2004.
20. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: Centers for Disease Control/National Institutes of Health, Fifth Edition, 2007.

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
628940

888-545-9495
July 2007
Revision 0