

Gebrauchsinformation für ELIMMUN-Diabetes Typ I

Enzym-Immunoassay zur kombinierten Bestimmung von Autoantikörpern gegen
Glutamat Decarboxylase (GAD65) und Tyrosinphosphatase (IA2) im Serum

Best.-Nr.: ED-100

Ausgabe: 2004-10

Diagnostische Bedeutung

Diabetes Typ I ist die schwerwiegendste und häufigste Stoffwechselkrankheit des Kindesalters. Diabetes Typ I ist eine Autoimmunerkrankung, in deren Verlauf die Insulin produzierenden Zellen des endokrinen Pankreas durch das körpereigene Immunsystem zerstört werden. Der immunologische Angriff erfolgt durch cytotoxische T-Zellen gegen Strukturen der körpereigenen Zielzellen und führt letztendlich zu deren Untergang. Die Folgen sind bekannt, es kommt zur absoluten Insulinabhängigkeit des Patienten (IDDM = **I**nsulin **D**ependent **D**iabetes **M**ellitus).

Die immunologische Attacke ist begleitet vom Auftreten von Autoantikörpern gegen zytoplasmatische Inselzellbestandteile (ICA), Insulin (IAA), Glutamat Decarboxylase (GAD) und die Tyrosinphosphatase (IA2). Einer oder mehrere dieser Autoantikörper sind bei fast allen Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose des Typ I Diabetes nachzuweisen. Sie sind aber meistens auch schon vor der Manifestation positiv und gelten als Marker der sogenannten „prädiabetischen Phase“.

Durch Nachweis der o. g. Autoantikörper lässt sich im Einzelfall das Risiko für die zukünftige Manifestation eines Typ I Diabetes vorhersagen. Forschungsergebnisse zeigen, dass durch den kombinierten Nachweis von Autoantikörpern gegen die beiden Autoantigene GAD und IA2 zum Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation mehr als 90 % aller Betroffenen erfasst werden können.

Der ELIMMUN-Diabetes Typ I ist ein standardisierter, einfach durchzuführender ELISA zur kombinierten und gleichzeitigen Detektion von Autoantikörpern gegen GAD65 und IA2 in einer Serumprobe. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten werden dabei mit einem rekombinanten Fusionsantigen (IA2c:605-977 / GAD65:1-585; Patent-Nr. EP 1 149 914) aus Tyrosinphosphatase und Glutamat Decarboxylase beschichtet.

Testprinzip

Die Vertiefungen einer vorbehandelten Mikrotiterplatte werden mit rekombinantem IA2-GAD-Fusionsprotein und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers beschichtet. Anschließend werden verdünnte Patientenserum und Calibratoren in den Vertiefungen inkubiert und bilden im Verlauf der Inkubation einen Antigen-Autoantikörperkomplex mit dem immobilisierten IA2-GAD-Fusionsantigen. Nicht gebundene Proteine werden durch Absaugen und Waschen entfernt. Im dritten Inkubationsschritt bindet Peroxidase-markiertes anti-human-IgG-Konjugat an die vorhandenen Immunkomplexe. Ungebundenes Konjugat wird durch Absaugen und Waschen entfernt. Die Peroxidase-Enzymaktivität wird durch Umsetzung des Substrates gemessen, die durch einen Farbumschlag von rosa nach blau, nach dem Abstoppen mit Schwefelsäure von blau nach gelb angezeigt wird. Diese Färbung kann in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm oder 450 / 630 nm gemessen werden.

Gefahrenhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Beachten Sie die Laborvorschriften für die Handhabung von infektiösem Material!

Bestandteile menschlichen Blutes, die für diesen Kit verwendet werden, stammen von Spendern, deren Blut individuell auf HIV-Antikörper, HBB_{SB} Ag und Anti-HCV untersucht und als nicht reaktiv befunden wurde.

Dennoch müssen alle Proben, biologischen Reagenzien und für die Testdurchführung verwendeten Materialien grundsätzlich als **potentiell infektiös** angesehen und entsprechend behandelt und entsorgt werden.

Stoppreakanz vorsichtig handhaben – verursacht schwere Verätzungen! Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich auswaschen und Arzt konsultieren. Niemals Wasser hinzugeben. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille / Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

Inhalt und Zusammensetzung der Testpackung

Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte, gebrauchsfertig 12 brechbare Riegel im Halterahmen	96 Einzelnapfchen
Coating-Lösung, gebrauchsfertig Komplex aus monoklonalem Antikörper und Fusionsantigen in Puffer mit antimikrobiellem Wirkstoff	1 x 12 ml-Fläschchen
Calibratoren 1 – 5, gebrauchsfertig Anti IA2/GAD65 -IgG-Standards (Humanserum mit Albumin und antimikrobiellem Wirkstoff) Die Calibratoren enthalten etwa 1,8, 9, 14, 28, 140 U/ml Genauere Konzentrationen für diese Testpackung sind auf beiliegendem Datenblatt angegeben.	5 x 1,2 ml-Fläschchen
IgG-Konjugat, gebrauchsfertig Meerrettich-Peroxidase-markiertes anti-human-IgG (Ziege) in Puffer mit antimikrobiellem Wirkstoff	1 x 12 ml-Fläschchen
Serumverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	3 x 50 ml-Fläschchen
Waschpufferkonzentrat, 10fach	2 x 50 ml-Fläschchen
Substrat, gebrauchsfertig Tetramethylbenzidin in Puffer mit H ₂ O ₂	1 x 12 ml-Fläschchen
Stoppreakanz, gebrauchsfertig 2,5 M Schwefelsäure	1 x 12 ml-Fläschchen
Klebestreifen	24 Stück
Datenblatt	1 Stück

Zusätzlich erforderliches Material

Mikrotiterplattenphotometer mit Filtern 450 nm oder 450/630 nm

Feuchtkammer/Brutschrank mit 37 °C

Manuelle oder automatische Waschanlage

Mikropipetten mit Einmalspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)

Vortexmischer

Röhrchen zur Probenverdünnung

Aqua dest.

Messzylinder

Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

Lagerung: bei + 2 °C bis + 8 °C unter Vermeidung starker Lichteinwirkung.

Das Verfalldatum der Testpackung befindet sich auf der Außen-Verpackung. Die Verfalldaten der einzelnen Reagenzien sind auf den jeweiligen Etiketten angegeben.

Haltbarkeit nach Öffnen

Die Haltbarkeit nach erstmaligem Öffnen ist auf dem Etikett der einzelnen Reagenzien angegeben.

Ansonsten ist für geöffnete Packungen zu beachten:

Beschichtete Mikrotiterplatte	Nicht benutzte Nöpfchen wieder dicht im Beutel verschließen und bei + 2 °C bis + 8 °C lagern.
Waschpufferkonzentrat	Angesetzter Puffer ist bei + 2 °C bis + 8 °C zwei Wochen haltbar. Eventuelle Ausfällungen im Konzentrat können durch Erwärmen auf 37 °C gelöst werden.

Probenmaterial

Im ELIMMUN-Diabetes Typ I kann Serum untersucht werden. Hämolytische, kontaminierte oder Proben, die Partikel enthalten, sind für den Test nicht geeignet.

Die Proben können bei + 2 °C bis + 8 °C bis zu 5 Tagen oder bei - 20 °C für längere Zeit gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Vorbereitung der Proben und Reagenzien

Vor dem Test müssen folgende Verdünnungen angesetzt werden:

Waschpufferkonzentrat	1:10 mit Aqua dest. verdünnen (z. B. 50 ml + 450 ml Aqua dest.)
Alle Serumproben	1:51 mit Serumverdünnungspuffer verdünnen (10 µl + 0,5 ml Puffer)

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig. Reagenzien aus verschiedenen Testpackungs-Chargen können nicht ausgetauscht werden.

Testdurchführung

Alle Reagenzien vor Gebrauch ca. 30 min bei Raumtemperatur (+ 20 °C bis + 25 °C) stehen lassen.

Proben und Reagenzien vor Verwendung sorgfältig schütteln. Beim Öffnen der Reagenzienflaschen und bei Entnahme der Reagenzien mikrobielle Kontamination vermeiden. Proben können in Einzelbestimmung gemessen werden. Die 5 Calibratoren müssen zum Erstellen einer Standardkurve bei jedem Ansatz mitgetestet werden. Eine freie Vertiefung für die Berechnung des Blank-Wertes vorsehen.

Pipettierschema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Probe 3										
B	Cal. 1	Probe 4										
C	Cal. 2	Probe 5										
D	Cal. 3											
E	Cal. 4											
F	Cal. 5											
G	Probe 1											
H	Probe 2											

1. Je 100 µl Coating-Lösung in die benötigten Vertiefungen pipettieren.
2. Platte abkleben und 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C inkubieren.
3. Platte 4 x mit je 350 – 400 µl Waschpuffer pro Vertiefung waschen, absaugen und zuletzt ausklopfen.
4. Je 100 µl Serumprobe (1:51 verdünnt) und Calibratoren 1 – 5 (gebrauchsfertig) in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
5. Platte abkleben und 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C inkubieren.
6. Platte 4 x mit je 350 – 400 µl Waschpuffer pro Vertiefung waschen, absaugen und zuletzt ausklopfen.
7. Je 100 µl Konjugat (gebrauchsfertig) pro Vertiefung pipettieren.
8. Platte abkleben und 30 Minuten bei 37 °C inkubieren.
9. Platte 4 x mit je 350 – 400 µl Waschpuffer pro Vertiefung waschen, absaugen und zuletzt ausklopfen
10. Je 100 µl Substrat pro Vertiefung pipettieren
11. Platte abkleben und exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur (+ 18 °C bis + 25 °C) vor intensivem Licht geschützt inkubieren.
12. In alle Vertiefungen je 100 µl Stoppreagenz in der Reihenfolge wie bei der Substratzugabe pipettieren.
13. Die Extinktion der Lösungen jeder Vertiefung bei 450 nm oder 450 / 630 nm messen. Die Messung sollte innerhalb 1 Stunde nach Stoppreagenzzugabe erfolgen.

Testauswertung

Sofern vom Photometer nicht automatisch die Extinktion des Blankwertes von den Extinktionen der Calibratoren und Patientenseren abgezogen wird, den Abgleich manuell durchführen.

Testgültigkeitskriterien

Die Extinktionen der Calibratoren müssen im Gültigkeitsbereich liegen, der auf dem beigelegten Datenblatt angegeben ist.

Treffen diese Annahmekriterien nicht zu, muss die Bestimmung wiederholt werden.

Quantitative Auswertung

Für die quantitative Auswertung wird anhand der fünf Calibratoren eine Standardkurve erstellt. Die Extinktionen aller fünf Calibratoren in Abhängigkeit von der Konzentration an IgG-Antikörpern gegen IA2/GAD65, ausgedrückt in U/ml, halblogarithmisch abbilden (Beispiel siehe Datenblatt).

Durch Interpolation der Extinktionswerte der Probe auf der Standardkurve ergibt sich das quantitative Ergebnis in U/ml.

Qualitative Auswertung

Wenn man den Test nur qualitativ mit der Anforderung positiv / negativ auswerten möchte, ist es ausreichend die Calibratoren 2 und 3 als Standards einzusetzen.

Proben, deren Extinktionen über der des Calibrators 3 liegen, sind als reaktiv für IgG-Antikörper gegen IA2/GAD65 zu betrachten. Proben, deren Extinktionen unter der des Calibrators 2 liegen, sind nicht reaktiv. Liegen die Extinktionen zwischen dem Calibrator 2 und 3 sind die Proben grenzwertig zu beurteilen und sollten genauer abgeklärt werden.

Interpretation der Ergebnisse

Eine Antikörperkonzentration von mind. 14 U/ml ist ein positives Ergebnis.

Enthält eine Probe weniger als 9 U/ml bedeutet dies, dass in diesem Serum kein signifikanter Antikörpertiter gegen IA2/GAD65 vorliegt.

Proben mit grenzwertigen Ergebnissen (zwischen 9 und 14 U/ml) sollten zur Bestätigung nochmals getestet werden.

Leistungsmerkmale des Tests

Messbereich

1,8 U/ml – 140,0 U/ml

Die Standardisierung des ELIMMUN-Diabetes Typ I erfolgte gegen international anerkannte Referenzseren (NIBSC, DASP).

Spezifität und Sensitivität

Insgesamt 395 Seren wurden im Vergleich zu Standardmethoden und einem kommerziell erhältlichen ELISA untersucht. Daraus ergab sich für den ELIMMUN-Diabetes Typ I:

Spezifität: 91,6 %
Sensitivität: 82,0 %

Von den 395 Seren wurden 357 = 90,4 % richtig bestimmt.

Präzision

Interassay: Vier Seren unterschiedlicher Reaktivität wurden in zehn unabhängig voneinander geführten Ansätzen untersucht.

	A	B	C	D
Mittelwert (Extinktion)	0,264	0,488	0,656	1,027
Standardabweichung	0,033	0,063	0,082	0,123
Variationskoeffizient %	12,52	12,91	12,56	4,07
Anzahl der Messungen	10	10	10	10

Intraassay: Sechs Seren unterschiedlicher Reaktivität wurden im Mehrfachansatz innerhalb einer antigenbeschichteten Platte getestet.

	E	F	G	H	I	J
Mittelwert (Extinktion)	0,184	0,320	0,438	0,619	0,883	1,082
Standardabweichung	0,014	0,022	0,026	0,014	0,050	0,030
Variationskoeffizient %	7,84	6,93	5,86	2,20	6,03	2,77
Anzahl der Messungen	48	48	48	12	12	14

Grenzen des Verfahrens

Eine endgültige klinische Diagnose darf nicht auf den Resultaten einer einzelnen diagnostischen Methode erstellt werden. Der Arzt muss die Anamnese und alle klinischen und Laborbefunde des Patienten berücksichtigen.

Mikrobielle Kontamination oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben kann die Messergebnisse verfälschen.

Literatur

- 1) Baekkeskov, S. et. al. (1990): Identification of the 64k autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347, 151 – 156
- 2) Bonifacio, E. et. al. (2000): Maturation of the humoral autoimmune response to epitopes of GAD in preclinical childhood type 1 diabetes. *Diabetes* 49, 202 – 208
- 3) Richter, W. et. al. (1992): Human monoclonal islet cell antibodies from a patient with insulin-dependent diabetes mellitus reveal glutamate decarboxylase as the target antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89, 8467 – 8471
- 4) Rickert M., Seissler J., Dangel W., Lorenz H., Richter W. (2001): Fusion proteins for combined analysis to the 65kDa Isoform of Glutamic Acid Decarboxylase and Islet Antigen-2 in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clinical Chemistry* 47:5, 926 – 934
- 5) Roll, U. & Ziegler, A. G. (1997): Combined antibody

Kurzanleitung

