

Testansatz

1 Kugel
20 µl Standards, Kontrollen und Proben laut Pipettierschema pipettieren
200 µl Assaypuffer
den Testansatz für mindestens 1 h bei 37°C inkubieren
Waschen mit 2 * 4 ml (z.B. mit dem Immunwasher von Berthold)
200 µl Tracer in alle Plastikröhrchen (12*75) pipettieren
den Testansatz mindestens 1 h bei 37°C inkubieren
Waschen mit 2 * 4 ml aqua dest. (z.B. mit dem Immunwasher von Berthold)
den Überstand dekantieren oder absaugen
die gebundene Aktivität im Luminometer 2 Sekunden zählen.

Standards

Bei der Auswertung ist darauf zu achten, daß die folgenden Konzentrationen Verwendung finden:

Standard	0	1	2	3	4
Konzentration [mU/g]:	0	25	50	100	800

Die Konzentrationsangabe der Standards sind Nominalwerte und beziehen sich auf die Verdünnung der Proben (1/10). Damit kann die Konzentration auf einen Gramm Stuhl ermittelt werden. Bei der Verwendung anderer Verdünnungen muß die reale Standardkonzentration angenommen werden. Die geschieht in dem die nominale Konzentration (Tabelle) durch 10 geteilt wird.

Auswertung

Auswertung: Nach dem Zählen der gebundenen Aktivität werden die Ergebnisse der Probenkonzentrationen

- automatisch berechnet (Auswerteverfahren: Spline-Approximation, Four-Parameter -Logistik, Logit-log, o.ä.) und ausgedruckt oder
- manuell ausgewertet: Die Mittelwerte der Absorption der Doppelwerte berechnen. Konzentration der Standards (Abszisse) gegen die Lichtemission (Ordinate) auftragen. Für die Patientenproben werden die Werte an der Standardkurve abgelesen.

Validierung

Die mitbestimmten Kontrollen sollten im folgenden Vertrauensbereich liegen:

Kontrolle 1:	→	40 - 60 mU/g
Kontrolle 2:	→	80 - 120 mU/g

Bestimmung der Anti Gliadin-sclgA im Stuhl mittels eines Immunochemoluminometrischen Nachweisverfahrens (ILMA).

Nur zu wissenschaftlichen Zwecken

Einführung

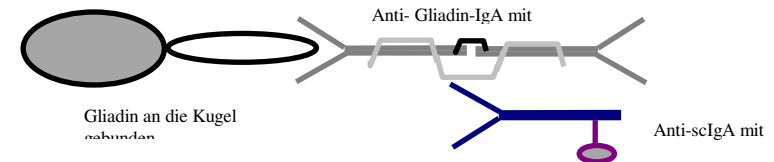
Zöliakie (Synonym Sprue) wird durch das Antigen des Getreides von Weizen, Roggen und Gerste hervorgerufen. Ein frühes Erkennen der Zöliakie ist sehr wichtig, da Folgeerscheinungen durch Einhaltung einer Gluten-freien Diät verhindert werden können. Gliadin-Antikörper sind vor allem charakteristisch für Gluten-sensitive Enteropathien. Nicht-invasive Diagnostiktests wie Anti-Gliadin- und Anti-Endomysium-Antikörperbestimmung haben eine hohe Sensitivität (>90 %) und hohe Spezifität (>95 %). Es ist jedoch eine Biopsie des Dünndarms erforderlich, um die Diagnose der Zöliakie zu bestätigen (Gold-Standard).

Vorteile

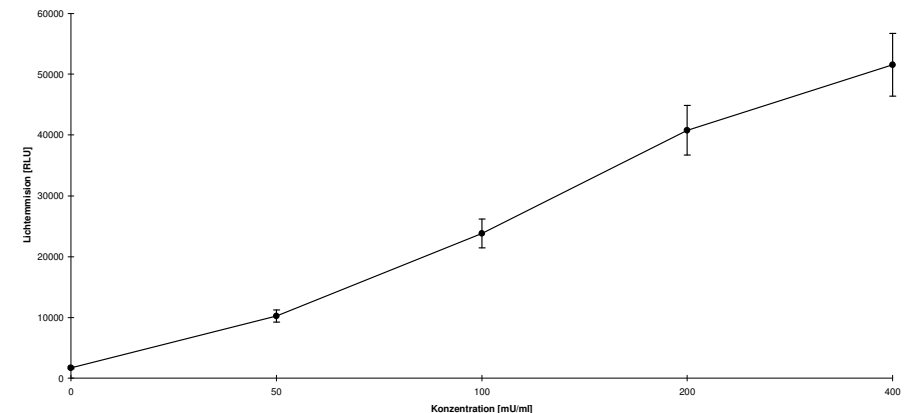
- Durch die Bestimmung von Anti-Gliadin-sclgA wird der Patient nicht weiter belastet, wie es bei einer Biopsie der Fall wäre. Dies ist besonders wichtig bei der Untersuchung von Kleinkindern.
- Durch die Detektion von sekretorischem IgA ist die Bestimmung für Stuhl spezifisch.
- Ein Screening ist durch diese Methode möglich.

Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode

Aus Weizen gereinigtes Gliadin ist an eine Polystyrolkugel gebunden. Die zu bestimmenden Stuhlverdünnungen werden in die Vertiefungen zusammen mit einer Kugel pipettiert. Während der Inkubationszeit binden die spezifischen Antikörper an das fixierte Antigen. Ungebundenes Material wird gewaschen und ein Akridiniumester gekoppelter Antikörper zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation mit nach folgendem Waschschritt wird die Lichtreaktion durch Zugabe von H₂O₂ und NaOH in einem Luminometer gestartet und die Lichtausbeute mit einem Photomultiplier detektiert. Die Lichtintensität ist proportional zu der Menge spezifischer Antikörper in den Röhrchen.



Mustereichkurve



Assay Parameter

Antigen an der Kugel:	Gliadin aus Weizenkeimen
2. Antikörper	Maus-Anti-human-sekretorisches-IgA
Probenmaterial:	Stuhl 1/10 in PPGNE
Probenvolumen	20 µl
Sensitivität (untere Nachweisgrenze):	1,6 mU/ml
Spezifität (Kreuzreaktivität)	keine Störung durch IgG, IgM und IgA.
Intraassayvarianz:	CV : 8,25 - 9,40 %
Interassayvarianz:	CV : 7,4 - 10,53 %
Meßbereich:	25 - 400 mU/g
Normbereich	< 100 U/l
Haltbarkeit der Proben	Kein Erkennbarer Abfall bei Lagerung im Kühlschrank und bei Raumtemperatur (24 °C)
Klinische Sensitivität	89% (cut Off 85 U/l)
Klinische Spezifität	81%

Zusammensetzung der Testkits

Menge	Artikel
gebrauchsfertig 100 Stk	100 Kugeln (die mit monoklonalen Antikörpern beschichtet sind. In einem proteinhaltigen Lagerungspuffer)
gebrauchsfertig 6 * 200 µl	5 Standards (in wäßriger Lösung mit Natriumazid).
Gebrauchsfertig 2 * 200 µl	Kontrollen Level 1 und 2 (in wäßriger Lösung mit Natriumazid.)
gebrauchsfertig 21 ml	Tracer (Akridiniumester markierter monoklonaler Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Natriumazid)
gebrauchsfertig 21 ml	Assaypuffer (Phosphatpuffer mit Natriumazid und Proteinzusatz pH 7,4)
in 470 ml warmem entionisiertem Wasser lösen.	Konzentrat für den Probenverdünnungspuffer (Phosphatpuffer mit Natriumazid und Proteinzusatz pH 7,4)

Aufbewahrung der Testkomponenten

Der gesamte Kit wird in tiefgefrorenem Zustand gelagert. Assaypuffer, Kugeln und Probenverdünnungspuffer können auch im Kühlschrank gelagert werden.

Probenmaterial und Probenhaltbarkeit

Die Stuhlproben werden vor der Bestimmung extrahiert und verdünnt. Die Haltbarkeit der Proben beträgt 5 Tage bei 4 °C oder 12 Monate in tiefgefrorenem Zustand.

Verwendete Geräte und Materialien

- 100 Einwegröhrchen (12*75 von Saarsedt)
- Probenständer und Ständer für Saarsedt-Röhrchen.
- Meßzylinder (500ml)
- 20 µl Pipette
- Multipette mit 5 ml und 50 ml Aufsatz
- Vortex-Mixer
- Luminometer
- Automatisches Waschgerät oder Handwaschgerät oder Wasserstrahlpumpe zum absaugen der Lösung

Methodendurchführung

Vorbereitungen für die Methodendurchführung	
1	Verdünnungsmedium: Das Röhrchen mit dem Probenverdünnungspufferkonzentrat wird in einem Wasserbad so lange erhitzt bis die Lösung klar ist. Danach wird der gesamte Inhalt in 470 ml entionisiertem Wasser gelöst und gut gemischt.
2	Kit-Komponenten und Probenmaterial auftauen: Die schonendste Möglichkeit besteht darin, den Kit, bzw. die Proben einen Tag vor Gebrauch vom Gefrierfach in den Kühlschrank zu stellen.
3	Vorbereitung der Stuhlproben: Stuhlproben werden eingewogen und 1 / 10 (Gewicht zu Volumen) mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt (Zu 1,0 g Stuhl werden 9 ml Puffer zugegeben). Die Proben werden so lange gemischt bis die Lösung homogen ist. Die Röhrchen werden 15 min bei 3000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wird im Assay direkt eingesetzt
4	Kugeln vor Gebrauch mit entionisiertem Wasser waschen.
5	Die für den Testansatz benötigten Stuhltracks eindeutig beschriften. Verwendete Gefäße: Der Testansatz erfolgt in Plastikröhrchen (12*75) in speziellen Ständern

Pipettierschema (für manuelles Pipettieren oder Pipettieren mit einem Probenverteilsystem)

Stuhltrack-röhrchen-Nr.		Volumen
1, 2	Standard 0	20 µl
3, 4	Standard 1	20 µl
5, 6	Standard 2	20 µl
7, 8	Standard 3	20 µl
9, 10	Standard 4	20 µl
11, 12	Standard 5	20 µl
13, 14	Kontrolle I	20 µl
15, 16	Kontrolle II	20 µl
17, 18	Proben	20 µl
alle 25 Proben	Kontrolle I, II	20 µl
am Ende der Serie	Kontrolle I, II	20 µl

Allgemeine Hinweise

- Dieser Testkit und alle darin enthaltenen Komponenten dürfen nur zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt zur in vitro-Diagnostik verwendet werden.
- Alle mitgelieferten Testkomponenten enthalten Natriumazid. Bitte alle Sicherheitsmaßnahmen ergreifen. Die Berührung mit der Haut sollte vermieden werden.
- Es sollte unter keinen Umständen mit dem Mund pipettiert werden.
- Während der Testdurchführung Einmalhandschuhe tragen.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Kit-Chargen dürfen nicht verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinischen Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Der Hersteller übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller zu übersenden.
- Der Testkit ist nach Ablauf des auf die Packung aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.