

Austestung zweier ELISAs zum Nachweis von Immunglobulin A-Defizienz und Anti-Immunglobulin A Antikörper

Katja Karlen, BMA 17-20 B

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Interregionale Blutspende SRK AG Bern

1. Zusammenfassung

Ein Immunglobulin A (IgA)-Mangel ist der häufigste Mangel an Immunglobulinen. Bei Personen mit einem solchen Mangel können sich Antikörper (Ak) gegen das IgA (Anti-IgA Ak) bilden. Diese Ak können bei einer Transfusion von IgA haltigen Blutprodukten zu Transfusionsreaktionen führen. Zur Bestimmung des IgA und der Anti-IgA Ak wird im Immunhämatologie Labor der Interregionalen Blutspende SRK AG Bern (IRB) die IgA-Defizienz und das Vorhandensein von Anti-IgA Ak mittels zweier ID-Partikel-Gel-Immuno-Assay (ID-PaGIA) Tests von BioRad bestimmt. Da diese Tests nicht mehr produziert werden, werden zwei Enzym-linked Immunosorbent Assays (ELISA) als Alternative ausgetestet.

Die Auswertung des Human IgA ELISA Kit von abcam ergibt, dass die Werte des ELISA mit den Vorwerten des ID-PaGIA gut übereinstimmen. Zusätzlich wird versucht, ob die Proben auch unverdünnt angesetzt werden können. Hierbei zeigt sich jedoch, dass Proben mit einem hohen IgA-Wert einen High-Dose-Hook-Effekt hervorrufen. Bei den Versuchen mit dem ELISA Kit für Anti-IgA von Cloud-Clone Corp., zeigt die Standardverdünnung sehr niedrige Werte der Optischen Dichte (OD). Somit werden alle Proben als positiv erkannt. Daher kann dieses ELISA Kit mit diesen Testdurchführungen nicht ausgewertet werden.

2. Einleitung

IgA ist das Immunglobulin, welches im Körper am meisten produziert wird. Ein IgA-Mangel ist die häufigste primäre Immunschwäche. Personen mit IgA-Mangel sind meistens vollkommen gesund. Sie können aber Anti-IgA Ak entwickeln. Diese Ak können bei einer Transfusion von Blutprodukten, welche Spuren von IgA enthalten, anaphylaktische Reaktionen hervorrufen. [1]

Das Vorhandensein von Ak gegen IgA hat für die Betroffenen keine negativen Folgen, solange sie keine IgA haltigen Blutprodukte erhalten. Benötigt eine Patientin oder ein Patient mit Anti-IgA Ak eine Transfusion, müssen gewaschene Erythrozytenkonzentrate (EK) verwendet werden. [2]

Eine weitere Möglichkeit kompatibel zu transfundieren, stellt die Transfusion von Blutprodukten IgA-defizienter Spenderinnen oder Spender dar. [1]

3. Ziele und Fragestellungen

Zielsetzung 1:

Austestung eines ELISA zum Nachweis von IgA-Defizienz.

Fragestellung 1:

Erkennt der ELISA die mit dem ID-PaGIA positiv ermittelten Werte auch als positiv und die negativen Werte auch als negativ und stimmen auch die Werte der gewaschenen Erythrozytenkonzentraten überein?

Zielsetzung 2:

Austestung eines ELISA zum Nachweis von Anti-IgA Ak.

Fragestellung 2:

Erkennt der ELISA die mit dem ID-PaGIA positiv ermittelten Werte auch als positiv und die negativen Werte auch als negativ?

4. Methodik und Material

Bei einem Sandwich ELISA sind an einer Festphase Ak oder Antigene immobilisiert. Zu diesen immobilisierten Ak oder Antigenen wird die zu untersuchende Flüssigkeit gegeben und es folgt eine Inkubation. Wenn ein zu diesem immobilisierten Material spezifischer Bindungspartner in der Probe enthalten ist, entsteht ein Immunkomplex. Danach werden ungebundene Ak und Antigene entfernt, dies geschieht meist durch einen Waschschrift. Zum zurückgebliebenen Immunkomplex wird ein Konjugat gegeben. Dies besteht aus einem Ak oder Antigen an welches ein Enzym gebunden ist. Das überflüssige Konjugat, welches sich nicht gebunden hat, wird wieder entfernt. Bei einem Einschnitt-Sandwich-Assay werden die Proben und das Konjugat miteinander zur Festphase gegeben und zusammen inkubiert. Durch die Zugabe des Substrats kommt es zu einer Farbreaktion. Je stärker die Farbe ist, desto mehr Immunkomplexe sind vorhanden, welche Konjugat gebunden haben. [3]

Mit dem Human IgA ELISA Kit von abcam wurden 13 Proben mit einer IgA-Defizienz und 10 Proben ohne IgA-Defizienz getestet. Dazu noch 17 Proben von gewaschenen Erythrozytenkonzentraten.

Mit ELISA Kit für Anti-IgA von Cloud-Clone Corp. wurden 11 Proben mit bekanntem Anti-IgA Ak und 5 Proben ohne IgA Ak getestet.

5. Ergebnisse/Resultate

Human IgA ELISA Kit von abcam

Proben mit und ohne IgA-Defizienz:

Alle Werte, welche mit dem ID-PaGIA IgA-Defizienz Test ein positives Ergebnis zeigen, sind auch beim ELISA IgA Test positiv. Die Proben, welche mit dem ID-PaGIA Test negativ sind, zeigen auch mit dem ELISA Test negative Resultate.

Proben von gewaschenen Erythrozytenkonzentraten:

Bei 13 Proben stimmen die Vorwerte und die Werte vom ELISA überein. Bei vier Proben welche bei ID-PaGIA negativ waren, zeigt der ELISA ein positiven Wert, der knapp über der Nachweisgrenze des ID-PaGIA Tests liegt.

High-Dose-Hook-Effekt:

Beim Ansatz von vier IgA positiven Proben in vier unterschiedlichen Verdünnungen zeigen die Proben beim unverdünnten Ansatz einen viel tieferen Wert als bei den anderen Ansätzen.

ELISA Kit für Anti-IgA von Cloud-Clone Corp.

Die Standardkurve zeigte bei jedem Testdurchlauf eine nur sehr schwache Reaktion, dadurch erzielten alle Proben, auch die die einen negativen Vorwert haben, einen positiven Wert.

6. Diskussion und Schlussfolgerung

Fragestellung 1

Bei der Austestung des ELISA zeigt sich, dass die Resultate des ELISA von normalen Serum- oder Plasmaproben, den Werten der bekannten Proben entsprechen. So zeigt sich eine starke Übereinstimmung der Resultate des ID-PaGIA mit dem ELISA IgA von abcam.

Die 17 Proben von gewaschenen EK sind keine Serum- oder Plasmaproben. Im Kit ist dies nicht als mögliches Probenmaterial angegeben. Jedoch zeigen sie bei den Versuchen plausible Resultate. Es scheint, dass dieses Probenmaterial keinen Einfluss auf den Test hat. Vier dieser Proben ergeben beim ELISA einen Wert von über 50 ng/ml, haben jedoch einen negativen Wert beim ID-PaGIA. Dies wahrscheinlich dadurch, da diese Werte nur wenig über der Nachweisgrenze des ID-PaGIA Kits liegen.

High-Dose-Hook-Effekt:

Da bei diesem Test die Proben sehr stark verdünnt werden müssen, ist er sehr anfällig für Verdünnungsfehler. Es wird versucht, ob die Proben auch unverdünnt angesetzt werden können. Es werden vier Proben unverdünnt und in drei unterschiedlichen Verdünnungen angesetzt. Hierbei zeigt sich ein High-Dose-Hook-Effekt. Somit ergibt sich ein tieferer Wert als die tatsächliche Konzentration.

Fragestellung 2

Bei der Testdurchführung zeigen die Standardverdünnungen viel zu tiefe OD. Die Standardkurve ist somit sehr niedrig. Dadurch ergaben alle Proben, auch die die einen negativen Vorwert hatten, einen positiven Wert. Da das Kit nur genug Standard für zwei Testdurchläufe enthält und der Test eine lange Lieferfrist hat, konnten keine weiteren Versuche mehr durchgeführt werden.

Ob die Resultate den bekannten Werten entsprechen, kann nicht beurteilt werden, da der ELISA nicht ausgewertet werden kann.

Quellenverzeichnis

[1] Yel, L. (2010). Selective IgA Deficiency. Journal of Clinical Immunology 2010/30, S.10-16. DOI 10.1007/s10875-009-9357-x

[2] Stöcker, W. (2019). Anti-IgA. Gressner A. M., Arndt, T. (Hrsg.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer Reference Medizin (S.296-297). Berlin, Heidelberg: Springer

[3] Töpfer, G. (2019). Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Gressner A. M., Arndt, T. (Hrsg.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer Reference Medizin (S.789-790). Berlin, Heidelberg: Springer