

Anti-GAD-ELISA (IgG)

Arbeitsanleitung

BESTELL-NR.	ANTIKÖRPER GEGEN	IG-KLASSE	SUBSTRAT	FORMAT
EA 1022-9601 G	Glutamat-Decarboxylase (GAD)	IgG	Ag-beschichtete Mikrotitergefäße	96 x 01 (96)

Indikation: Der vorliegende ELISA-Testsatz dient der quantitativen In-vitro-Bestimmung humaner Autoantikörper gegen Glutamat-Decarboxylase (GAD) aus Serum oder Plasma zur Diagnose von Diabetes mellitus Typ 1 (insulinpflichtiger Diabetes mellitus, IDDM).

Stellenwert: Autoantikörper gegen die 65-kDa-Isoform der Glutamat-Decarboxylase (GAD) sind bei bis zu 90 % aller Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose des Diabetes mellitus Typ 1 nachweisbar und können bereits Jahre vor der klinischen Manifestation der Erkrankung detektiert werden. Vor Ausbruch der Erkrankung weisen sie auf ein hohes individuelles Diabetesrisiko hin. Der Nachweis von Anti-GAD Autoantikörpern ermöglicht die frühzeitige Diagnose des Diabetes mellitus Typ 1, der meist schon im Kindesalter auftritt. Bei Erwachsenen lässt sich durch den Autoantikörpernachweis die Spätmanifestation des Typ-1-Diabetes (LADA, latent insulinpflichtiger autoimmuner Diabetes im Erwachsenenalter) eindeutig diagnostizieren.

Testprinzip: Die Testpackung enthält Mikrotiterstreifen zu je 8 vereinzelbaren Reagenzgefäßen, die mit GAD beschichtet sind. Die Reagenzgefäße werden im ersten Analyseschritt mit den Patientenproben inkubiert. Bei positiven Proben binden sich spezifische Antikörper an die GAD. Die immobilisierten Antikörper können bivalent wirken und somit auch an die Biotin-markierte GAD binden, welche in einem zweiten Inkubationsschritt in die Reagenzgefäße gegeben wird. Zur Detektion des gebundenen Biotins wird ein dritter Inkubationsschritt mit Enzym-markiertem Avidin (Enzymkonjugat) ausgeführt, das eine sich anschließende Farbreaktion katalysiert. Die Intensität der gebildeten Farbe verhält sich proportional zur Konzentration der Antikörper gegen GAD.

Inhalt einer Testpackung:

Bezeichnung	Farbe	Format	Symbol
1. Antigen-beschichtete Reagenzgefäße 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 vereinzelbaren Reagenzgefäßen im Rahmen, gebrauchsfertig	---	12 x 8	
2. Kalibrator 1 bis 6 2000 / 250 / 120 / 35 / 15 / 5 IE/ml (IgG, human), gebrauchsfertig	farblos	6 x 0,7 ml	
3. Negative Kontrolle 0 IE/ml (IgG, human), gebrauchsfertig	farblos	1 x 0,7 ml	
4. Positive Kontrolle (IgG, human), gebrauchsfertig	farblos	1 x 0,7 ml	
5. GAD, Biotin-markierte GAD, lyophilisiert	farblos	3 x 5,5 ml	
6. GAD-Puffer, gebrauchsfertig	rosa	2 x 15 ml	
7. Enzymkonjugat Peroxidase-markiertes Avidin, 20fach konzentriert	farblos	1 x 0,7 ml	
8. Konjugatpuffer, gebrauchsfertig	farblos	1 x 15 ml	
9. Waschpuffer, 10fach konzentriert	farblos	1 x 125 ml	
10. Chromogen/Substratlösung TMB/H ₂ O ₂ , gebrauchsfertig	farblos	1 x 15 ml	
11. Stopplösung, 0,25 M Schwefelsäure, gebrauchsfertig	farblos	1 x 12 ml	
12. Haftfolie	---	3 Stück	
13. Qualitätskontrollzertifikat	---	1 Protokoll	
14. Arbeitsanleitung	---	1 Heft	
Chargen-Bezeichnung			Lagertemperatur
In-vitro-Diagnostikum			ungeöffnet verwendbar bis

Änderungen zur Vorversion sind grau unterlegt.



Vorbereitung und Haltbarkeit der Reagenzien

Hinweis: Sämtliche Reagenzien müssen ca. 30 Minuten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) gebracht werden. Nach erstmaligem Öffnen sind die Reagenzien **bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar**, wenn sie bei +2 °C bis +8 °C gelagert und gegen Kontamination geschützt werden, und es im nachfolgenden Text nicht ausdrücklich anders beschrieben ist.

- **Beschichtete Reagenzgefäße:** Gebrauchsfertig. Die Schutzhülle der Mikrotiterplatte aufschneiden. Schutzhülle erst öffnen, wenn der Inhalt Raumtemperatur angenommen hat, damit die Präparate nicht feucht werden! Nicht gebrauchte Reagenzgefäße einer angebrochenen Mikrotiterplatte sofort wieder in die Schutzhülle legen und mit der integrierten Gripnaht dicht verschließen (Trockenbeutel nicht entfernen).
Nach dem erstmaligen Öffnen der Schutzhülle sind die Antigen-beschichteten Reagenzgefäße trocken bei +2 °C bis +8 °C gelagert 4 Monate lang haltbar.
- **Kalibratoren und Kontrollen:** Gebrauchsfertig. Die Reagenzien sind vor Gebrauch gründlich zu durchmischen.
- **GAD:** Lyophilisiert. Der Inhalt eines Fläschchens ist mit 5,5 ml GAD-Puffer zu rekonstituieren. Wenn mehrere Fläschchen verwendet werden sollen, sind deren Inhalte nach Rekonstitution zu vereinigen. Das rekonstituierte GAD ist vor Gebrauch **vorsichtig** zu durchmischen, ohne dass sich Luftblasen bilden.
Das rekonstituierte GAD ist, bei +2 °C bis +8 °C gelagert, maximal 3 Tage lang haltbar.
- **Enzymkonjugat:** Das Enzymkonjugat ist 20fach konzentriert. Das benötigte Volumen ist dem Fläschchen mit einer sauberen Pipettenspitze zu entnehmen und mit Konjugatpuffer **1:20** zu verdünnen (1 Teil Reagenz plus 19 Teile Konjugatpuffer). Das Enzymkonjugat ist vor Gebrauch gründlich zu durchmischen.
Das gebrauchsfertige Enzymkonjugat ist, bei +2 °C bis +8 °C gelagert, maximal 16 Wochen lang haltbar.
- **Waschpuffer:** Der Waschpuffer ist 10fach konzentriert. Sollten im konzentrierten Puffer Salzkristalle auftreten, den Puffer auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut durchmischen. Das benötigte Volumen ist der Flasche mit einer sauberen Pipettenspitze zu entnehmen und mit entionisiertem oder destilliertem Wasser **1:10** zu verdünnen (1 Teil Reagenz plus 9 Teile Wasser).
Beispiel: Für 1 Mikrotiterstreifen 5 ml Konzentrat plus 45 ml Wasser.
Der gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer ist bei +2 °C bis +8 °C gelagert und bei sachgerechter Handhabung bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- **Chromogen/Substratlösung:** Gebrauchsfertig. Die Flasche sofort nach Gebrauch wieder verschließen, da die Lösung lichtempfindlich ist . Die Chromogen/Substratlösung muss klar sein, wenn sie vor Benutzung bereits bläulich gefärbt ist, darf sie nicht mehr verwendet werden.
- **Stopplösung:** Gebrauchsfertig.

Lagerung und Haltbarkeit: Die Testpackung ist bei +2 °C bis +8 °C aufzubewahren, nicht einfrieren! Ungeöffnet sind die Testsatzkomponenten bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Entsorgung: Patientenproben, Kalibratoren, Kontrollen und inkubierte Mikrotiterstreifen sind wie infektiöser Abfall zu handhaben. Alle Reagenzien sind nach den gesetzlichen Vorschriften zu entsorgen.

Warnung: In den Kalibratoren und Kontrollen humanen Ursprungs ließen sich weder HBsAg, noch Antikörper gegen HCV, HIV-1 und HIV-2 nachweisen. Dennoch sollte man mit allen Testkomponenten ebenso vorsichtig umgehen wie mit infektiösem Material. Einige der Reagenzien enthalten **außerdem geringe Mengen von Natriumazid**. Hautkontakt ist zu vermeiden.

Vorbereitung und Haltbarkeit der Proben

Probenmaterial: Humanes Serum, EDTA-Plasma.

Haltbarkeit: Die zu untersuchenden **Patientenproben** können in der Regel bei +2 °C bis +8 °C bis zu 14 Tage aufbewahrt werden. Eine Lagerung der Proben ist auch bei -20 °C oder tieferen Temperaturen möglich. Wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen der Proben sind zu vermeiden.



Inkubation

Zur Durchführung eines **quantitativen Tests** verwendet man die **Kalibratoren 1 bis 6**, die negative und positive Kontrolle sowie die **unverdünnten** Patientenproben.

Proben-Inkubation: (1. Schritt)

Entsprechend dem Pipettierschema je **25 µl** Kalibrator, Negativ- und Positivkontrolle oder Patientenproben in die einzelnen Reagenzgefäße pipettieren. Die Reagenzgefäße abdecken und **1 Stunde** auf einem **Mikrotiterplattenschüttler (500 U/min)** bei Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) inkubieren.

Waschen:

Manuell: Haftfolie entfernen. Reagenzgefäße entleeren und anschließend 3x mit jeweils 350 µl gebrauchsfertig verdünntem Waschpuffer waschen.

Automatisch: Reagenzgefäße 3x mit je 450 µl gebrauchsfertig verdünntem Waschpuffer waschen (Programm-Einstellung: z. B. TECAN Columbus Washer „Overflow Modus“).

Den Waschpuffer in jedem Reagenzgefäß **pro Waschzyklus 30 bis 60 Sekunden** einwirken lassen, anschließend absaugen oder ausschütten. Nach dem Waschvorgang bei manueller Durchführung die Mikrotiterplatte mit den Öffnungen nach unten kräftig auf Vliespapier ausschlagen, um Waschpufferreste vollständig zu entfernen.

Freie Positionen innerhalb des Mikrotiterstreifens sind mit leeren Reagenzgefäßen desselben Plattenformates wie das des zu untersuchenden Parameters aufzufüllen.

GAD-Inkubation: (2. Schritt)

Jeweils **100 µl** GAD (Biotin-markierte GAD) in die Reagenzgefäße pipettieren. Die Reagenzgefäße **abdecken**.

1 Stunde auf einem **Mikrotiterplattenschüttler (500 U/min)** bei Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) inkubieren.

Waschen:

Reagenzgefäße entleeren. Waschen wie oben.

Konjugat-Inkubation: (3. Schritt)

Jeweils **100 µl** Enzymkonjugat (Peroxidase-markiertes Avidin) in die Reagenzgefäße pipettieren. Die Reagenzgefäße **abdecken**.

20 Minuten auf einem **Mikrotiterplattenschüttler (500 U/min)** bei Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) inkubieren.

Waschen:

Reagenzgefäße entleeren. Waschen wie oben.

Achtung: Flüssigkeitsreste (>10 µl), die nach dem Waschvorgang in den Reagenzgefäßen verbleiben, können einen Einfluss auf die Substratumsetzung haben und zu falsch erniedrigten Extinktionswerten führen.

Unzureichendes Waschen (z. B. weniger als 3 Waschzyklen, zu geringe Waschpuffervolumina oder zu geringe Einwirkzeiten) kann zu falsch erhöhten Extinktionswerten führen.

Substrat-Inkubation: (4. Schritt)

Jeweils **100 µl** Chromogen/Substratlösung in die Reagenzgefäße pipettieren. **20 Minuten** bei Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) inkubieren, vor direkter Sonneneinstrahlung schützen.

Stoppen:

Jeweils **100 µl** Stopplösung in die Reagenzgefäße pipettieren, in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit wie bei der Zugabe der Chromogen/Substratlösung.

Messen:

Die **photometrische Auswertung** der Farbintensität sollte **innerhalb von 15 Minuten nach dem Stoppen** bei **450 nm Messwellenlänge**, danach bei **405 nm Messwellenlänge** und einer Referenzwellenlänge zwischen 620 nm und 650 nm erfolgen. Vor dem Messen die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln, um eine homogene Verteilung der Farblösung zu gewährleisten.



Pipettierschema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K 1	P 1	P 9	P 17								
B	K 2	P 2	P 10	P 18								
C	K 3	P 3	P 11	P 19								
D	K 4	P 4	P 12	P 20								
E	K 5	P 5	P 13	P 21								
F	K 6	P 6	P 14	P 22								
G	neg.	P 7	P 15	P 23								
H	pos.	P 8	P 16	P 24								

Das für die Mikrotiterstreifen 1 bis 4 angegebene Pipettierschema gilt beispielhaft für die **quantitative Analyse** von 24 Patientenproben (P 1 bis P 24).

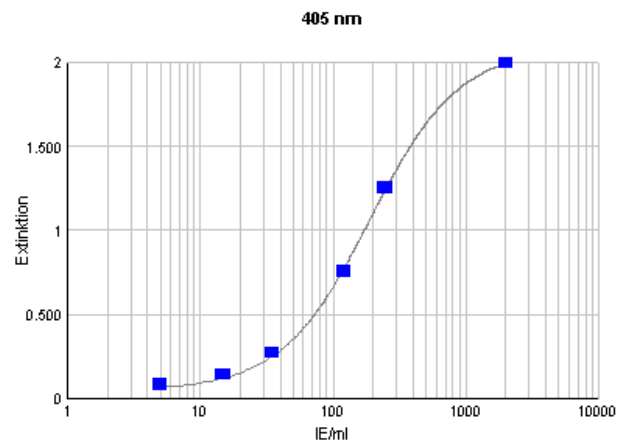
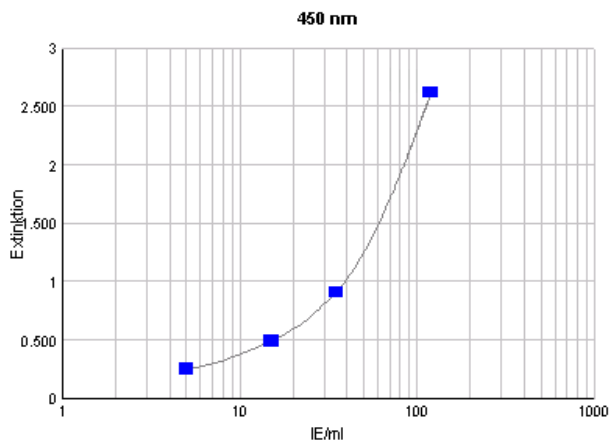
Kalibratoren (K 1 bis K 6), negative (neg.) und positive (pos.) Kontrolle, sowie Patientenproben werden jeweils in Einzelbestimmung eingesetzt. Die Zuverlässigkeit der Bestimmung kann noch gesteigert werden, wenn man jede Probe doppelt einsetzt.

Die positive und die negative Kontrolle dienen als interne Prüfung für die Zuverlässigkeit des Testverlaufs. Sie sollten bei jedem Testdurchlauf verwendet werden.

Testauswertung

Quantitativ: Nach Auftragen der gemessenen Extinktionen für die **Kalibratoren 3 bis 6 (450 nm) oder Kalibratoren 1 bis 6 (405 nm)** im linearen Maßstab auf der y-Achse gegen die entsprechenden Konzentrationen im logarithmischen Maßstab auf der x-Achse können Kalibrationskurven erstellt werden, mit deren Hilfe die GAD-Antikörperkonzentrationen der unbekannten Proben ermittelt werden können. Zur computergesteuerten Berechnung der Kalibrationskurven können folgende Auswerteverfahren alternativ verwendet werden: 4 Parameter Logistik, Spline-Funktion oder Punkt zu Punkt (450 nm). **Niedrige Konzentrationen (<35 IE/ml, Kalibrator 4)** sollten mit Hilfe der **450 nm-Kalibrationskurve** und **hohe Konzentrationen (>35 IE/ml)** mit Hilfe der **405 nm-Kalibrationskurve** ausgewertet werden. Nachfolgend sind typische Beispiele für Kalibrationskurven aufgeführt. Verwenden Sie diese Kurven bitte nicht zur Ermittlung der GAD-Antikörperkonzentrationen in Patientenproben.

Kalibrator/Kontrolle	Extinktion bei 450 nm	Extinktion bei 405 nm
Kalibrator 1	>4,00	1,99
Kalibrator 2	>4,00	1,25
Kalibrator 3	2,62	0,75
Kalibrator 4	0,91	0,27
Kalibrator 5	0,49	0,14
Kalibrator 6	0,25	0,08
Negative Kontrolle	0,12	0,04



Liegt die Extinktion einer Patientenprobe unterhalb des Kalibrators 6 (5 IE/ml), ist das Ergebnis mit „<5 IE/ml“ anzugeben. Liegt die Extinktion einer Patientenprobe oberhalb des Kalibrators 1 (2000 IE/ml), ist das Ergebnis mit „>2000 IE/ml“ anzugeben. Es empfiehlt sich, diese Probe mit Anti-GAD-negativem Serum z. B. 1:20 zu verdünnen und in einem neuen Testansatz wiederholt zu messen. Das aus der Kalibrationskurve ermittelte Ergebnis in IE/ml muss entsprechend diesem Beispiel dann noch mit dem Verdünnungsfaktor 20 multipliziert werden.

Der von EUROIMMUN empfohlene obere Grenzwert des Normalbereiches (**Cut-Off**) beträgt **10 internationale Einheiten pro Milliliter (IE/ml)**. EUROIMMUN schlägt folgende Befundinterpretation vor:

<10 IE/ml:	negativ
≥10 IE/ml:	positiv

Bei Doppelbestimmungen ist der Mittelwert für Berechnungen zu verwenden. Weichen die Ergebnisse einer Doppelbestimmung erheblich voneinander ab, empfiehlt EUROIMMUN, die Probe erneut zu messen.

Für die Diagnose ist neben dem serologischen Befund auch immer die Klinik des Patienten zu beachten.

Test-Charakteristika

Kalibrierung: Die Kalibrierung wurde unter Verwendung des 1. WHO-Referenzreagenzes für Inselzellantikörper (WHO, 1999, Reagenz 97/550, National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, England) in internationalen Einheiten (IE) vorgenommen. Der NIBSC-Reagenz 97/550 enthält laut Definition 100 IE Anti-GAD pro Ampulle.

25 IE/ml entsprechen 1 U/ml (relative Einheiten pro Milliliter) im EUROIMMUN Anti-GAD-RIA.

Bei jedem Testansatz müssen die internationalen Einheiten der positiven und der negativen Kontrolle innerhalb der für jede Charge angegebenen Toleranzen liegen. Ein Qualitätskontrollzertifikat mit den entsprechenden Daten ist beigelegt. Wenn diese Anforderungen nicht erfüllt sind, können die Testergebnisse ungenau sein, und der Test sollte wiederholt werden.

Antigen: Humane, rekombinante Glutamat-Decarboxylase (GAD), Isoenzym GAD65, wurde zur Beschichtung der Reagenzgefäße und zur Herstellung der biotinylierten GAD eingesetzt.

Nachweisempfindlichkeit: Die untere Nachweisgrenze ist definiert als der Mittelwert einer analytfreien Probe plus der dreifachen Standardabweichung und gibt den geringsten eindeutig erfassbaren Antikörpertiter an. Die untere Nachweisgrenze des Anti-GAD-ELISA liegt bei **0,59 IE/ml**.



Analytische Spezifität: Der vorliegende ELISA weist spezifisch die gegen Glutamat-Decarboxylase (GAD), Isoenzym GAD65, gerichteten humanen Autoantikörper nach.

Serumproben von 176 Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE, n = 9), rheumatoider Arthritis (RA, n = 10), Morbus Basedow (MB, n = 86), Hashimoto Thyreoiditis (HT, n = 10) und Typ 2 Diabetes mellitus (DM2, n = 61) (Herkunft: Europa) zeigten keine Kreuzreaktionen im Anti-GAD-ELISA. Für 5 Seren (SLE: n = 1, MB: n = 2, HT: n = 1, DM2: n = 1) wurde eine Antikörperkonzentration von größer 10 IE/ml ermittelt.

Interferenzen: Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 5 mg/ml für Hämoglobin, von 3000 mg/dl für Intralipid und von 20 mg/dl für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

Reproduzierbarkeit: Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurden die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten mit 2 Seren in verschiedenen Bereichen der Kalibrationskurve ermittelt. Den Intra-Assay-Variationskoeffizienten liegen jeweils 25 Bestimmungen und den Inter-Assay-Variationskoeffizienten jeweils 20 Bestimmungen zugrunde.

<i>Intra-Assay-Variation, n = 25</i>		
Serum	Mittelwert (IE/ml)	VK (%)
1	20,0	8,5
2	97,2	7,3

<i>Inter-Assay-Variation, n = 20</i>		
Serum	Mittelwert (IE/ml)	VK (%)
1	21,0	5,2
2	96,9	5,7

Methodenvergleich: Bei 215 Seren (Herkunft: Deutschland) wurden die GAD-Antikörperkonzentrationen sowohl mit dem ELISA als auch mit einem RIA als Referenztest (EUROIMMUN AG) bestimmt. Von den untersuchten Seren waren 131 Seren in beiden Assays positiv und 77 Seren in beiden Assays negativ. Von den restlichen 7 Seren wurden 5 Seren positiv im RIA und negativ im ELISA und 2 Seren positiv im ELISA und negativ im RIA gemessen. Die Sensitivität des ELISA bezogen auf den RIA liegt bei 96 %, bei einer Spezifität von 98 %.

Klinische Sensitivität und Spezifität: Es wurden alle Seren (n = 140, davon 50 Seren von Patienten mit frisch manifestiertem Typ 1 Diabetes mellitus und 90 Seren von Blutspendern; Herkunft: USA) des Islet-Autoantikörper-Standardisierungsprogramms (IASP, 2015) gemessen. Die für den ELISA ermittelte Sensitivität beträgt 82 %, bei einer Spezifität von 99 %.

Referenzbereiche: Zur Ermittlung des Normalbereichs wurden 300 Seren gesunder Blutspender (Herkunft: Europa) gemessen. 99 % der ermittelten Anti-GAD-Antikörperkonzentrationen aller Seren liegen unterhalb des Cut-off-Wertes von 10 IE/ml.

Weiterhin wurden 39 Seren von Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus (Patientengruppe 1) und 74 Seren von Patienten mit Verdacht auf Typ 1 Diabetes mellitus (Patientengruppe 2) (Herkunft: Europa) analysiert. In 90 % der Seren der Patientengruppe 1 und 50 % der Seren der Patientengruppe 2 wurden mit dem ELISA Anti-GAD-Antikörperkonzentrationen oberhalb von 10 IE/ml gefunden.

Jedes Labor sollte jedoch unter Verwendung repräsentativer Proben seine eigenen Referenzbereiche erstellen.

Klinische Bedeutung

Der Diabetes mellitus Typ I (Typ-1-Diabetes, T1DM, T1D) ist eine organspezifische Autoimmunerkrankung, die durch eine selektive Zerstörung der Insulin-produzierenden Beta-Zellen gekennzeichnet ist. Sowohl das Auftreten als auch die Progression der Autoimmunreaktionen wird beeinflusst durch das Zusammenwirken dreier Komponenten, nämlich der genetischen Prädisposition, einer gestörten Immunregulation und exogener Faktoren.



In der Mehrzahl der Fälle ist der T1D eine **polygene Erkrankung** genetisch belasteter Personen. Mehr als 20 verschiedene Genloci mit Assoziationen zum T1D wurden bisher beschrieben. Den weitaus bedeutendsten Einfluss auf die Diabetesentstehung hat der HLA-Genotyp. Das familiär gehäufte Auftreten von T1D kann bis zu 50 % durch das Vorhandensein bestimmter HLA-Allele erklärt werden, wobei die Genotypen HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 und HLA DR4-DQ8/DR4-DQ8 mit dem höchsten Diabetesrisiko assoziiert sind. Etwa die Hälfte der Kinder, die bereits vor dem 5. Lebensjahr T1D entwickeln, weist einen dieser Hochrisikogenotypen auf. Ca. 20 % der Kinder von Eltern, die an T1D leiden und Träger eines Hochrisikogenotyps sind, entwickeln bereits vor dem 2. Lebensjahr Inselzell-Autoantikörper.

Die wesentlichen Ziele (Autoantigene) der T1D-spezifischen Autoimmunreaktionen sind die Inselzellen (endokriner Anteil des Pankreasgewebes, zytoplasmatische Inselzellantigene), die 65-kDa-Isoform des Enzyms Glutamatdecarboxylase (GAD65), die Tyrosinphosphatase-homologen Proteine IA-2 (IA2 α und IA-2 β), der Zinktransporter 8 (ZnT8) sowie Insulin und die Insulin-Vorstufe Proinsulin. Die Reaktion des Immunsystems gegen diese Proteine der körpereigenen insulinproduzierenden Beta-Zellen kann Monate bis Jahre andauern. Der Nüchternblutzucker steigt aber erst an, wenn ca. 80 % der Beta-Zellen zerstört sind. Deshalb ist ein erweitertes Risiko-Screening unumgänglich, um frühzeitig eine Zerstörung der Beta-Zellen anzuzeigen und Aussagen zur Prognose zu machen.

Als exogene Faktoren werden „Noxen“ (Virusinfektionen, z. B. mit Coxsackie-B-, Rubi-, Echo-, Cytomegalie-, Herpes-Viren; belastende chemische Substanzen, z. B. Bafilomycine; bestimmte Nahrungsmittel etc.) und psychische Komponenten (Stress, „seelisches Leid“ etc.) diskutiert. Beispielsweise entwickeln Kinder mit familiärer T1D-Belastung zu 100 % Insel-Autoantikörper, wenn HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 vorliegt und bereits vor dem 4. Lebensmonat Kuhmilch oder glutenhaltige Nahrung konsumiert wird.

Die Unterscheidung verschiedener Diabetes-Erkrankungstypen wurde von der WHO 1965 vorgenommen, 1998 geändert, 2000 von der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) übernommen und 2009 modifiziert als Leitlinie festgelegt:

- Typ-1-Diabetes mellitus:
Die Zerstörung der Beta-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas führt zum absoluten Insulinmangel.
- Typ-2-Diabetes mellitus:
Er kann sich erstrecken von einer genetisch bedingten Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem absoluten Insulinmangel im späteren Krankheitsverlauf. Er ist häufig mit anderen Problemen des metabolischen Syndroms assoziiert.
- 8 andere spezifische Diabetes-Typen (z. B. Gestationsdiabetes)

Die Anzahl der Diabetes-mellitus-Patienten ist global weitgehend erfasst. 2010 litten 6,4 % der Weltbevölkerung (285 Millionen Menschen) an Diabetes, davon 10 % an T1D. Die Inzidenz (Rate der Neuerkrankungen) ist weltweit im Steigen begriffen. Sie wird jährlich auf 3 % geschätzt. 2030 werden weltweit 7,7 % (ca. 640 Millionen) erkrankt sein.

In Deutschland leiden ca. 350.000 Menschen an T1D, davon Kinder und Jugendliche im Alter bis zu 14 Jahren ca. 15.000; jährlich werden zwischen 2.100 und 2.300 Neuerkrankungen in dieser Altersgruppe registriert. Etwa 500.000 vermeintliche Typ-2-Diabetiker sind wahrscheinlich an einem T1D/LADA (latent autoimmune diabetes with onset in adults) erkrankt, die ohne spezifischen Autoantikörnernachweis häufig fehldiagnostiziert und folglich nicht adäquat behandelt werden.

Das **klinische Bild** des Diabetes-mellitus-Spätsyndroms beginnt mit Polyurie, Polydipsie, Nykturie, Gewichtsverlust und Müdigkeit. Die Schwere der Stoffwechselentgleisungen wird von manifester Mikroangiopathie (Arteriosklerose des Diabetikers) beherrscht. Weiterhin können Polyendokrinopathien, Neuropathien sowie Retinopathie, diabetische Glomerulosklerose, Gangrän und diabetisches Koma als Komplikationen auftreten, die für die meist reduzierte Lebenserwartung verantwortlich sind.

Für die **serologische Diagnose** des T1D stellt die Bestimmung von spezifischen Autoantikörpern das immunologische Instrumentarium dar. Bei neu manifestiertem Diabetes ist der Autoantikörnernachweis ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung zwischen Typ-1-Diabetes und nicht-autoimmunen Diabetesformen wie Typ-2-Diabetes. Autoantikörper gegen Beta-Zell-Proteine, sogenannte Inselzellautoantikörper, sind die besten diagnostischen Marker, um einen beginnenden oder bereits bestehenden Autoimmunprozess zu erkennen und die Progression im Verlauf zu beobachten.



Mittels hoch spezifischer und hoch sensativer serologischer Tests wie ELISA (mit rekombinanten Proteinantigenen), RIA (Radioimmunoassay mit radioaktiv markierten Autoantigenen) sowie IIFT (BIOCHIP-Mosaik® mit transfizierten Zellen) können die wesentlichen Autoantikörper zum Nachweis von T1D bestimmt werden, und zwar gegen:

- **GAD65** (Glutamatdecarboxylase)
Häufigkeit bei Ausbruch des T1D 70 % bis 90 %.
Die 65 kDa-Glutamat-Decarboxylase wird hauptsächlich in den Inselzellen des Pankreas synthetisiert.
Die Prävalenz ist altersunabhängig.
- **IA2** (Tyrosin-Phosphatase IA-2)
Häufigkeit bei 50 % bis 70 % der Kinder und Jugendlichen und 30 % bis 50 % der Erwachsenen.
Das 105 kD-transmembrane Inselzell-spezifische Antigen IA2 stellt neben GAD das Hauptantigen beim T1D dar. Die Geschwindigkeit der Progression korreliert mit der Titerhöhe.
Die Prävalenz ist altersunabhängig.
- **ICA** (Inselzellen des Pankreas, zytoplasmatische Inselzellantigene)
Häufigkeit bei Ausbruch des T1D 80 %.
Im weiteren Krankheitsverlauf nehmen die Titer ab, so dass die Autoantikörper nach ca. 10 Jahren nur noch bei 10 % der Patienten nachweisbar sind.
Die Prävalenz sinkt mit steigender Krankheitsdauer.

Anmerkung:

Der Nachweis von Autoantikörpern gegen die GAD in höherer Konzentration kann als Hinweis gewertet werden auf ein Stiff-Person-Syndrom (früher: Stiff-Man-Syndrom), eine Erkrankung mit progredienter Muskelrigidität und sekundärer Einsteifung nahezu aller Gelenke, sowie auf eine progressive Enzephalomyelitis mit Rigidität (PER).

Das initiale T1D-Autoantikörper-Screening bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen (bis etwa 25 Jahre) sollte nach Möglichkeit verschiedene Autoantikörper mittels ELISA, RIA oder IIFT bestimmen und zur Beurteilung der Autoantikörperreaktivität in angemessenen Zeitabständen (1 bis 3 Jahre, in Abhängigkeit vom Alter und Diabetesrisiko) kontrollieren, insbesondere bei Kindern und Jugendlichen, da hier Veränderungen in der Autoantikörperantwort häufiger und schneller auftreten.

Da sich beim T1D in 90 % aller Fälle bereits vor dem Zeitpunkt der klinischen Manifestation ein oder mehrere Diabetes mellitus-assoziierte Autoantikörper im Serum feststellen lassen, können Personen mit erhöhtem Erkrankungsrisiko frühzeitig identifiziert werden können. Je früher und intensiver die Autoantikörperantwort (Anzahl der positiven Inselzell-Autoantikörper, Autoantikörperaffinität, Höhe der Autoantikörpertiter), desto größer ist das Diabetesrisiko. Hohe Autoantikörpertiter sind mit einer Progression zum T1D verbunden. Die Ausweitung der Immunantwort auf weitere Zielantigene kann als qualitativ veränderte, aggressivere autoimmune Zerstörung der Beta-Zellen gewertet werden. Je früher im Leben die ersten Autoantikörper nachgewiesen werden, desto höher ist das Risiko für eine Progression der Insel-Autoimmunität. Von den Kindern, die bereits im 1. Lebensjahr multiple Autoantikörper aufweisen, erkranken innerhalb von 2 Jahren ca. 50 % an T1D.

Durch serodiagnostische Früherkennung und serodiagnostische Verlaufsbeobachtung der „prädiabetischen Phase“ ist eine rechtzeitige **Intervention** möglich:

1. Primärprävention zur Verhinderung von Insel-Autoimmunität bei Kindern mit genetischer Prädisposition
2. Sekundärprävention zur Verhinderung der Diabetesmanifestation bei Kindern und Erwachsenen mit Inselzell-Autoimmunität
3. Tertiärprävention zur Verhinderung von Spätkomplikationen bei Patienten mit T1D

Die neuen **Therapieansätze** verfolgen das therapeutische Konzept einer Modulation des Autoimmunprozesses mit langfristiger Toleranzentwicklung gegenüber Insel-Zell-Antigenen und damit Schutz der Beta-Zellen vor Zerstörung. Die aktuellen Ansätze sind zeitlich begrenzte allgemeine Immunsuppression einschließlich einer Depletion aktivierter autoreaktiver T-Zellen (z. B. Anti-CD3-Antikörper) und eine antigenspezifische Immunmodulation durch Vakzination mit einem Autoantigen (z. B. orales/intranasales Insulin).

**Hinweis:**

Wie eine aktuelle multizentrische Analyse von nahezu 30.000 Fällen (Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene) aus Deutschland und Österreich gezeigt hat, leiden T1D-Patienten nicht selten an weiteren Autoimmunerkrankungen. Neben T1D wurden nachgewiesen Autoimmun-Thyreoiditis bei ca. 20 %, Zöliakie bei ca. 11 %, Autoimmun-Adrenalitis bei ca. 10 % und Autoimmun-Gastritis bei ca. 6,5 % der Erkrankten. An 3 bzw. 4 Autoimmunerkrankungen gleichzeitig litten 1 % bis 2 % dieser T1D-Patienten.

Patentangaben

Es gelten das europäische Patent 1448 993 B1, das chinesische Patent ZL02822274.1, das indische Patent 226484, das japanische Patent 5711449 und das US-Patent 8,129,132 B1. Die US Patente 6,682,906 B1 und 6,277,586 B1 (für RSR lizenziert) finden außerdem Anwendung.

Literaturliste

1. Achenbach T, Pan L, Ziegler AG. **Frühdiagnostik bei Typ-1-Diabetes.** Diabetologe (2008) 47-58.
2. Boerschmann H, Walter M, Achenbach P, Ziegler AG. **Survey of recent clinical trials of the prevention and immunointervention of type 1 diabetes mellitus.** [Article in German] Dtsch Med Wochenschr 135 (2010) 350-354.
3. Decochez K, Truyen I, van der Auwera B, Weets I, Vandemeulebroucke E, de Leeuw IH, Keymeulen B, Mathieu C, Rottiers R, Pipeleers DG, Gorus FK. **Combined positivity for HLA DQ2/DQ8 and IA-2 antibodies defines population at high risk of developing type 1 diabetes.** Diabetologia 48 (2005) 687-694.
4. EUROIMMUN AG. Stöcker W, Schlumberger W, Krüger C. **Alle Beiträge zum Thema Autoimmun-diagnostik.** In: Gressner A, Arndt T (Hrsg.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2012).
5. Julier C, Akolkar B, Concannon P, Morahan G, Nierras C, Pugliese A. **The Type I Diabetes Genetics Consortium 'Rapid Response' family-based candidate gene study: strategy, genes selection, and main outcome.** Genes Immun 10 (2009) 121-127.
6. Krüger* C, Stöcker* W, Schlosser M. (*EUROIMMUN AG). **Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies.** Antibodies 2 (2007) 369-378.
7. Rich SS, Akolkar B, Concannon P, Erlich H, Hilner JE, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Pociot F, Todd JA. **Current status and the future for the genetics of type I diabetes.** Genes Immun 10 (2009) 128-131.
8. Stöcker* W, Schaper J, Schuhose Ch, Vieregge P, Kömpf D, Scriba PC. (*EUROIMMUN AG). **Autoantibodies against cerebral gray matter in patients with insulin dependent diabetes mellitus.** Immunobiol 181 (1990) 223.
9. van Deutekom AW, Heine RJ, Simsek S. **The islet autoantibody titres: their clinical relevance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and the classification of diabetes mellitus.** Diabet Med 25 (2008) 117-125.
10. Vieregge P, Branczyk B, Barnett W, Stöcker* W, Soyka D, Kömpf D. (*EUROIMMUN AG). **Stiff-Man-Syndrom. Bericht über vier Fälle.** Nervenarzt 65 (1994) 712-717.
11. Warncke K, Fröhlich-Reiterer EE, Thon A, Hofer SE, Wiemann D, Holl RW. **Polyendocrinopathy in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes: a multicenter analysis of 28,671 patients from the German/Austrian DPV-Wiss database.** Diabetes Care 33 (2010) 2010-2012.
12. Yu L, Liu Y, Miao D, Wenzlau J, Davidson H, Hutton J, Eisenbarth GS. **Triple chimeric islet auto-antigen IA2-ZnT8WR to facilitate islet autoantibody determination.** J Immunol Methods 353 (2010) 20-23.





Pipettierschema für den ELISA

	Kalibratoren	Kontrollen	Proben
Kalibratoren 1 bis 6	25 µl		
Negative Kontrolle		25 µl	
Positive Kontrolle		25 µl	
Patientenprobe			25 µl

1 Stunde bei RT auf Schüttler (500 U/min) inkubieren

3 x waschen

GAD	100 µl
-----	--------

1 Stunde bei RT auf Schüttler (500 U/min) inkubieren

3 x waschen

Enzymkonjugat	100 µl
---------------	--------

20 Minuten bei RT auf Schüttler (500 U/min) inkubieren

3 x waschen

Substrat	100 µl
----------	--------

20 Minuten bei RT inkubieren
(vor direkter Sonneneinstrahlung schützen)

Stopplösung	100 µl
-------------	--------

Kurz schütteln und Messung der Extinktion bei 450 nm und 405 nm