

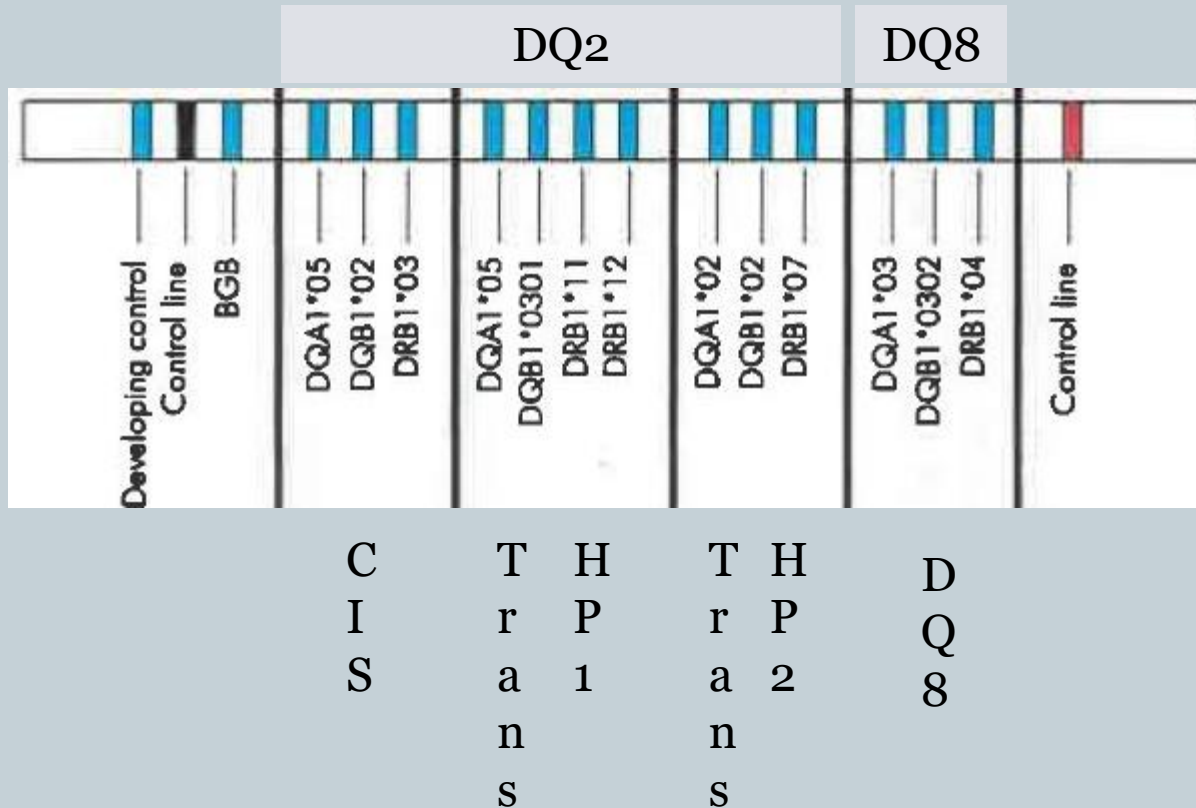


# Zöliakie

Operon Celiac Strip Assay

MAG. THOMAS MAYERHOFER  
UK ST. PÖLTEN

# Layout des Operon Strips



# Änderungen gegenüber der Operon Anleitung

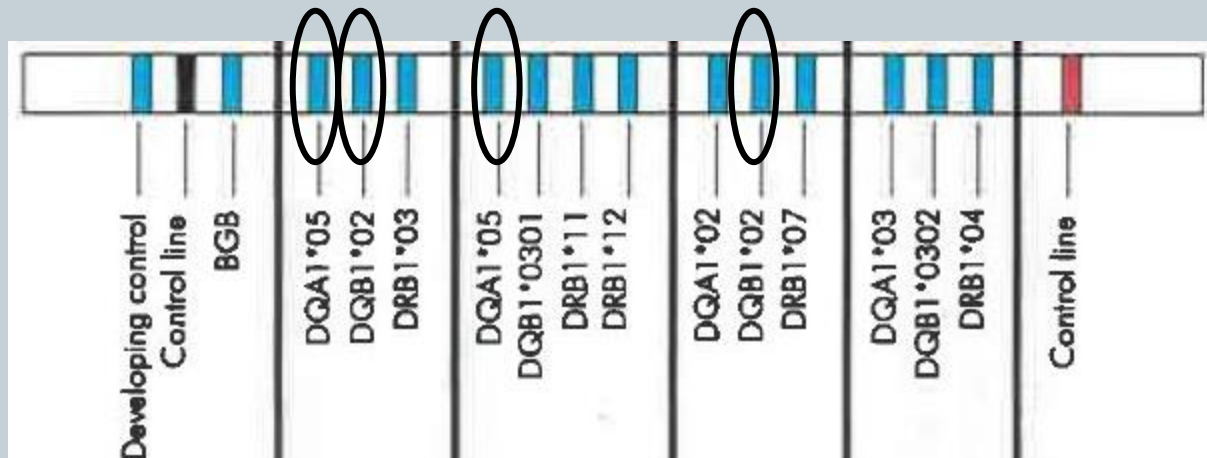


- Laut Ringversuch „DETECTION OF HLA ALLELES ASSOCIATED WITH DISEASES“ des Dept. of HLA analysis NRL for DNA diagnostics, U Nemocnice 1, 128 00 Prague 2 und den Erläuterungen der Rundversuchsleiterin Barbora Kinská, ist die von Operon mitgelieferte Interpretation fehlerhaft.
- Siehe auch - J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012; 54(1): 136-60 (chapter 2.1 page 142).
- DRB1 ist lediglich meist mit Zöliakie assoziiert, aber nicht ausschlaggebend!
- Wichtig sind nur die DQA1 und DQB1 Varianten!

# Kombinationen und ihr Ergebnis



- DQA1\*05 + DQB1\*02



## ○ CIS

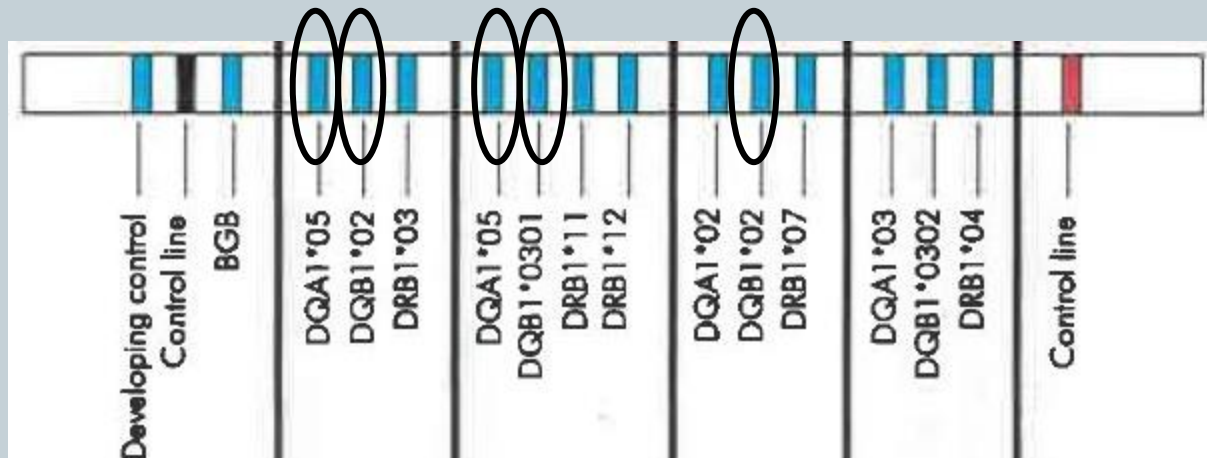
- ✦ DQ2.5 Positiv, DQ8 negativ

- Genotyp ist mit Zöliakie assoziiert, das Ergebnis kann nicht alleine als Bestätigte Zöliakie betrachtet werden.

# Kombinationen und ihr Ergebnis



- $DQA1^*05 + DQB1^*02^*0301$



- CIS und Trans HP1 Carrier.

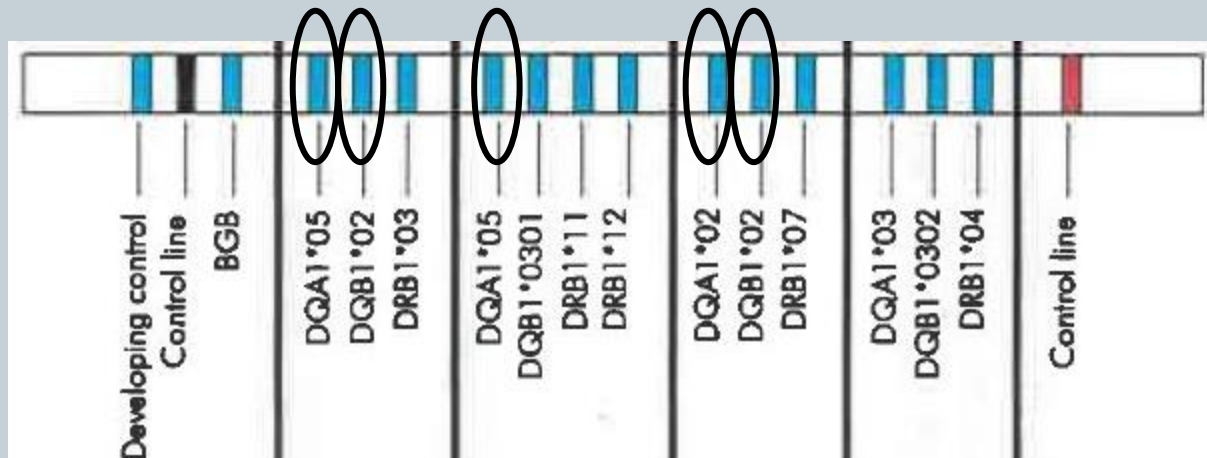
- ✦ DQ2.5 Positiv, DQ8 negativ

- Genotyp ist mit Zöliakie assoziiert, das Ergebnis kann nicht alleine als Bestätigte Zöliakie betrachtet werden.

# Kombinationen und ihr Ergebnis



- DQA1\*02, \*05 + DQB1\*02



- CIS und Trans HP2 Carrier.

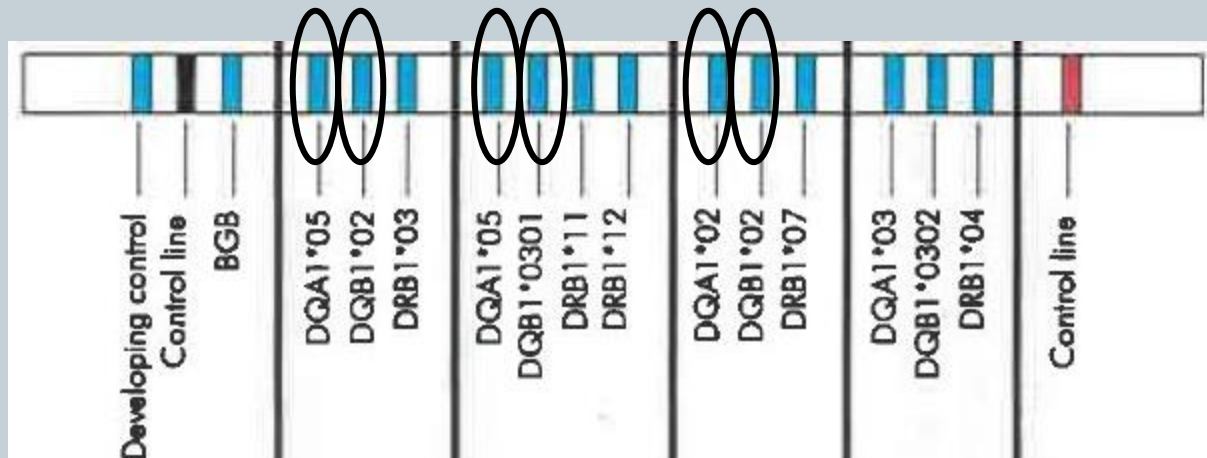
- ✦ DQ2.5 Positiv, DQ8 negativ

- Genotyp ist mit Zöliakie assoziiert, das Ergebnis kann nicht alleine als Bestätigte Zöliakie betrachtet werden.

# Kombinationen und ihr Ergebnis



- DQA1\*02, \*05 + DQB1\*02 \*0301



## ○ TRANS

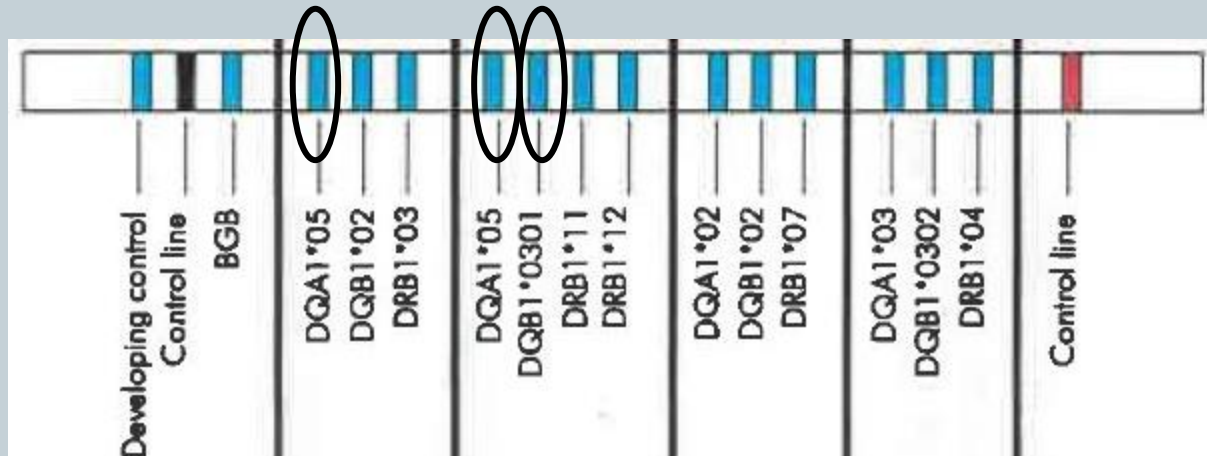
- ✦ DQ2.5 Positiv, DQ8 negativ

- Genotyp ist mit Zöliakie assoziiert, das Ergebnis kann nicht alleine als Bestätigte Zöliakie betrachtet werden.

# Kombinationen und ihr Ergebnis



- DQA1 \*05 + DQB1\*0301



## ○ HP1 Carrier

- ✦ **DQ2 negativ**, DQ8 negativ

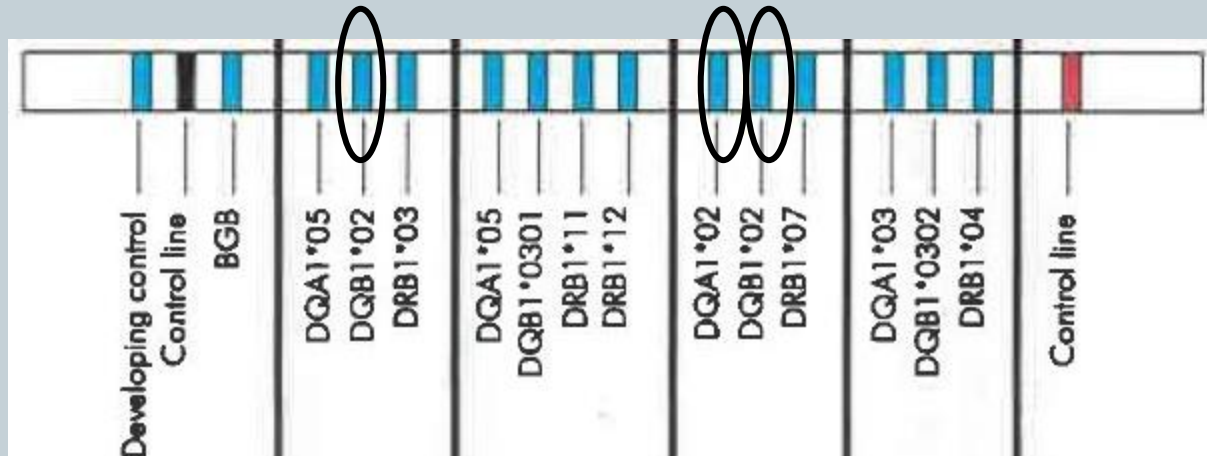
- Genotyp ist mit nicht Zöliakie assoziiert, das Ergebnis kann eine Zöliakie mit höchster Wahrscheinlichkeit ausschließen.



# Kombinationen und ihr Ergebnis



- DQA1 \*02 + DQB1\*02



- HP2 Carrier

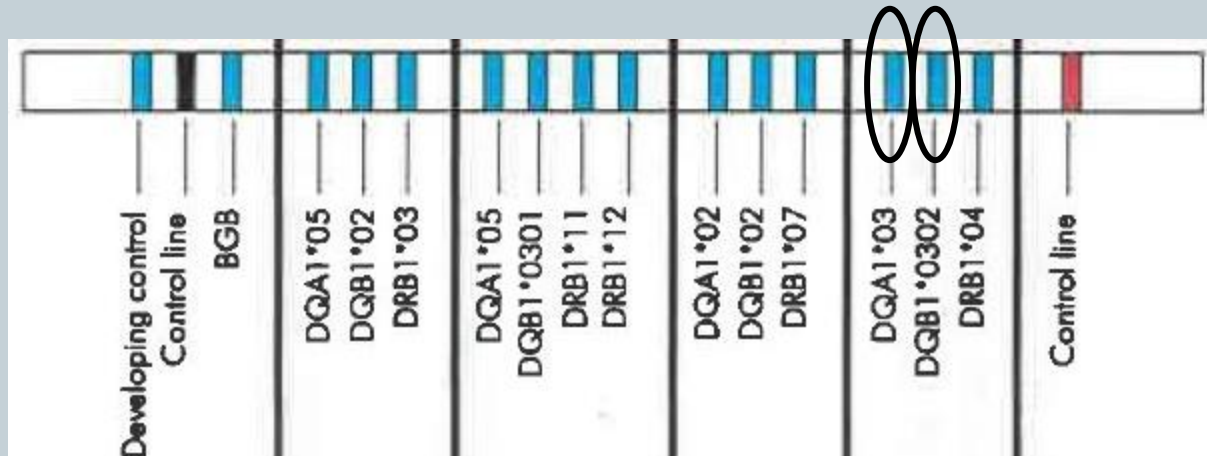
- ✦ DQ2.2 POSITIV, DQ8 negativ

- Genotyp ist mit einer **seltenen Form von Zöliakie** assoziiert!  
Das Ergebnis kann nicht alleine als Bestätigte Zöliakie betrachtet werden.

# Kombinationen und ihr Ergebnis



- DQA1\*03 + DQB1\*0302



## ○ DQ8

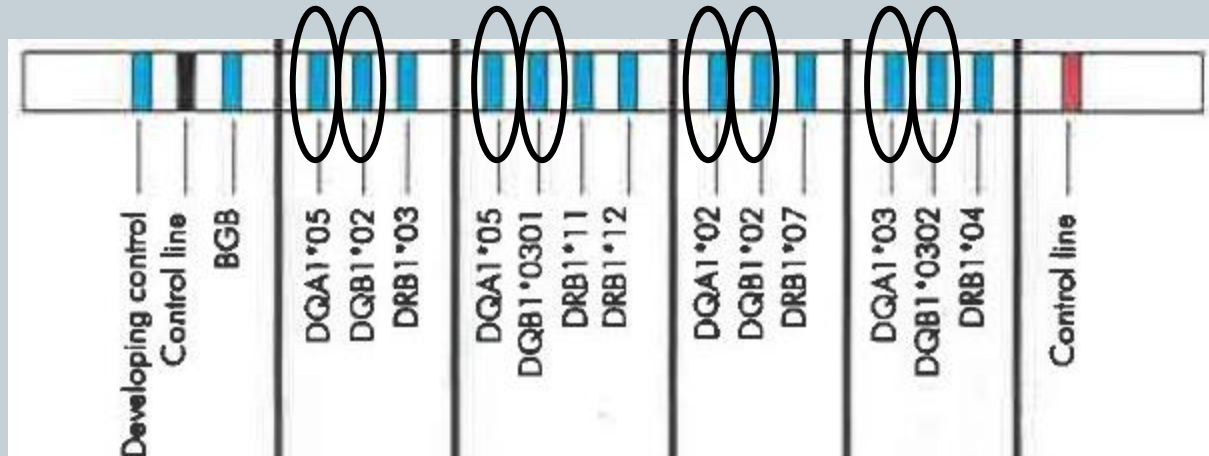
- ✦ DQ2 negativ, DQ8 positiv

- Genotyp ist mit Zöliakie assoziiert, das Ergebnis kann nicht alleine als Bestätigte Zöliakie betrachtet werden.

# Eindeutig fehlerhafte Kombination



- DQA1\*02\*03\*05 und/oder DQB1\*02\*0301\*0302



## ○ Eindeutig fehlerhaft

- ✦ DQ2 positiv, DQ8 positiv

- Genotyp ist mit Zöliakie assoziiert, das Ergebnis kann nicht alleine als Bestätigte Zöliakie betrachtet werden.

# Umrechnung von $\text{c}/\mu\text{l}$ in $\text{c}/\text{ml}$



Die Standards werden meist in  $\text{c}/\mu\text{l}$  geliefert.

zB in    10  $\text{c}/\mu\text{l}$   
          100  $\text{c}/\mu\text{l}$   
          1000  $\text{c}/\mu\text{l}$   
          10000  $\text{c}/\mu\text{l}$

Daraus kann man eine Eichkurve erstellen und erhält als Ergebnis X  $\text{c}/\mu\text{l}$ .

Wenn die Probe zB einen CP von 31,5 hat, dann sind das 5  $\text{c}/\mu\text{l}$  – in der PCR ermittelt!

Als Ergebnis gefragt ist jedoch meist  $\text{c}/\text{ml}$ .

5 c/ $\mu$ l bedeuten 5 c/ $\mu$ l in der zugegebenen DNA!

Wenn in den PCR Ansatz 5  $\mu$ l gegeben werden, wurden also 25 Copies zugegeben.

Wenn in den PCR Ansatz 25 $\mu$ l DNA gegeben werden, dann hat man 125 Copies zugesetzt!

Der Nachweis wird einfacher und damit sensibler, weil mehr Eluat (und damit DNA) zugesetzt wurde => **der CP Wert wird niedriger!**

Die Menge an C/ $\mu$ l in der Extrahierten DNA hängt von der Menge des verwendeten Ausgangsmaterials ab UND von der Menge an Eluat, in der sie gelöst wird.

# Beispiel



Es befinden sich 1000c/ml im Blut des Patienten.

1. Es werden 400 $\mu$ l Blut aufgereinigt und in 100 $\mu$ l eluiert:

400 $\mu$ l Blut = 400 Copies.

Diese 400 Copies in 100 $\mu$ l ergibt 4 C/ $\mu$ l

2. Es werden 600 $\mu$ l in 50 $\mu$ l eluiert:

600 $\mu$ l = 600 Copies

In 50 $\mu$ l = 12 C/ $\mu$ l

# PCR Ansatz



Zu jedem PCR Ansatz muss DNA gegeben werden.

Dabei handelt es sich um  $X\mu\text{l}$  des Eluats.

Wenn jetzt in eine PCR  $10\mu\text{l}$  Eluat gegeben werden, dann werden bei Beispiel 1 40 Copies zugegeben, bei Beispiel 2 jedoch 120 Copies!

Beispiel 2 wird „sensitiver“ sein, obwohl alles andere gleich ist.

=> Je konzentrierter das Eluat desto niedriger der CP Wert.

# Rückrechnung auf C/ml

- zB: die PCR ergibt zB 10c/μl
- Dann kann man die c/ml nur errechnen, wenn man weiss, aus wie viel Ausgangsmaterial in wie viel Eluat aufgereinigt wurde.
- Die Formel dafür ist:
- $$X \text{ c/ml} = \frac{\text{PCR Ergebnis in c/}\mu\text{l} * \text{Eluationsvolumen in } \mu\text{l}}{\text{Ausgangsvolumen in ml}}$$



# Beispiel

- PCR ergibt 10 c/μl
- Aufgereinigt wurden 400μl Blut und in 50μl Puffer eluiert.
- $X \text{ c/ml} = 10 * 50 / 0,4 = 1250 \text{ c/ml}$
- 10c/μl entsprechen **in diesem Fall** 1250 c/ml

# Anders rum gerechnet.

- Man hat eine Lösung mit geeichten 1000c/ml
- Wie viel ist dann im Eluat?
- 0,4 ml in 100 $\mu$ l: 400 c auf 100 $\mu$ l => 4 c/ $\mu$ l
- 0,6 ml in 50 $\mu$ l: 600 c auf 50 $\mu$ l => 12 c/ $\mu$ l

# LOD (Limit of Detection)



- Das Limit of Detection ist die Menge an Virus, die gerade noch detektiert werden kann (in 95% der Fälle)
- Wie in den Folien zuvor erläutert, hängt dieses nicht nur von der PCR Chemie ab sondern auch sowohl von den Aufreinigungs Bedingungen ab, als auch von der Menge des eingesetzten Eluats!
- Je höher die Konzentration des Eluats ist und je mehr davon eingesetzt wird, desto wahrscheinlicher ist es, dass etwas detektiert werden kann.
- Daher sind unterschiedliche PCRs nicht leicht vergleichbar, wenn man nicht alle Einflussgrößen mit berücksichtigt!
- Für jede PCR muss für jedes Setup das LOD erneut gemessen und errechnet werden! Man kann nicht einfach Werte eines anderen Labors übernehmen, wenn sich eine der Einflussgrößen ändert!

Danke für ihre Aufmerksamkeit

