



ELISA ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Microwell Method

Anti-DGP IgG

Cat. No. R11462
For in vitro Diagnostic Use

P r o d u c t I n s e r t

ELISA souprava pro **kvantitativní** stanovení IgG protilátek k deaminovaným gliadinovým peptidovým epitopům (DGP)



Microwell Method - 96 wells
(12 x 8-well potažené protilátkou)

Odlamovatelné

ZÁKLADNÍ INFORMACE

- **Vlnová délka**

Měřící filtr: 450 nm

Volitelný referenční filtr: 600 - 690 nm

- **Doba inkubace**

60 minut při LT (30/15/15)

- **Enzyme Conjugate**

HRP (Křenová peroxidáza)

- **Substrate**

TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin)

- **Vzorek**

Sérum nebo plazma

- **Stabilita vzorků**

neředěné: 5 dní při 2-8°C; až 6 měsíců v - 20 °C

- **Kalibrační rozmezí**

0-100IU/ml

- **Sezitivita**

1 IU/ml

- **Životnost a stabilita komponentů soupravy**

Souprava: 18 měsíců od data výroby.

Komponenty soupravy: Viz štítek na lahvičce

Sample Diluent Conc.: stabilní 30 po naředění (při 2-8°C)

Wash Buffer Conc.: stabilní 30 po naředění (při 2-8°C)

- **Indikace**

Celiakie

SLOŽENÍ SOUPRAVY

| | | |
|---|---|--|
| Microplate Mikrotitrační destička | 1 | Oddělitelné mikroplatíčko skládající se z 12 modulů o 8 jamkách, potažené deaminovaným bílkovinným proteinem. K přímému použití |
| Calibrators Kalibrátory | 6 | Lahvičky, každá 1,5 ml, Kombinované kalibrátory s třídou IgG třídou Anti-DGP protilátkami (A-Fv sérové/pufrové matrici (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)). K přímému použití. 0, 6,3, 12,5, 25, 50, 100 U/ml |
| Controls Kontroly | 2 | Lahvičky, 1,5 ml, Anti-DGP kontroly v sérové/pufrové matrici (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) pozitivní (1) a negativní (2), K přímému použití. Viz quality control certificate pro očekávané hodnoty a rozsah |
| Sample Diluent | 1 | lahvička, 20 ml, Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w). žlutý, koncentrát (5x). |
| Enzyme Conjugate Enzym konjugát | 1 | lahvička, 15 ml, Enzym konjugát (PBS, Proclin 300 <0,5% (v/v)), (světle červený) obsahuje králičí Polyklonální anti-human IgG; značené křenovou peroxidázou. K přímému použití. |
| Substrate Solution Substrát | 1 | lahvička TMB, 15 ml, K přímému použití |
| Stop Solution Stopovací roztok | 1 | lahvička kyseliny fosforečné (<5%), 15 ml, K přímému použití. |
| Wash Buffer Promývací roztok | 1 | lahvička, 20 ml, PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w). Koncentrát (50x). |

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL

Vybavení

- Reader mikrotitračních destiček s možností nastavení odečítání absorbance při 450 nm.
- Multikanálové mikropipety
- Míchadlo
- Makropipety 10 µl, 100 a 1000 µl
- Stopky
- Software na vyhodnocení dat

Příprava činidel

- Deionizovaná nebo destilovaná voda
 - Odměrné válce 100 a 1000ml
 - nádoba na skladování promývacího roztoku
- Fotometry a promývačky jsou v nabídce firmy DIALAB.

NÁZEV A POUŽITÍ

Anti-DGP IgG DIALAB GmbH je ELISA (Enzyme-linked Immunosorbant Assay) pro kvantitativní stanovení protilátek (IgG) proti deaminovaným gliadinovým peptidovým epitopům proteinům (DGP) v lidském séru nebo plazmě. Stanovení napomáhá při určování diagnózy při podezření na celiakii.

SHRNUTÍ

Celiakie (synonyma: celiakální sprue, glutenová enteropatie) je enteropatie, která je spojena se zánětem a atrofií klků v tenkém střevě. Onemocnění je založeno na intoleranci lepku. Spouštěčem tohoto autoimunitního onemocnění u pacientů s genetickými predispozicemi je příjem potravin s obsahem lepku (pšenice, žito, ječmen atd.)^{1, 2}.

Celiakie postihuje až 1% populace všeho věku^{3, 4}, u některých postižených zůstává toto onemocnění nedignostikováno kvůli různorodým příznakům. Kromě typického klinického obrazu, např. malabsorpce (chronický průjem, plynatost, ztráta hmotnosti atd.), je onemocnění spojováno s atypickými projevy jako dermatitis herpetiformis, diabetes typu 1, osteoporóza, některé lymfomy, nedostatek železa, chronická únava a potraty. Někdy jsou příznaky nejasné nebo úplně chybí^{5, 6}.

Patogeneze celiakie je pochopena pouze částečně. Po resorpci gliadinu (z lepku) je deaminován tkáňovou transglutaminázou (tTG) v lamínu propria střevní tkáňové membráně, která způsobí, že některá rezidua glutaminu jsou nahrazena rezidui kyseliny glutamové. Fragmenty Gliadinu (deaminované peptidy gliadinu) se naváží na HLA antigen molekuly, kde jsou rozpoznány odpovídajícími T-lymfocyty v kontextu HLA-DQ2 a HLA-DQ8 molekulami. Výsledek je rozsáhlá imunitní odpověď, která způsobí tvorbu protilátek proti DGP a proti tTG^{7, 8}. Tyto protilátky (IgA, IgG) mohou být klinicky prověřeny spolu s dalšími laboratorními testy k potvrzení celiakie.

U sér pacientů s podezřením na celiakii jsou detekovány obě protilátky IgA a IgG proti gliadinu⁹. Významná část pacientů postrádají IgA¹⁰, proto screeningové testy obsahují obě protilátky (IgA a IgG). Pomocí kvantifikace IgA protilátek může být stanovena a udržována bezlepková dieta¹¹.

PRINCIP TESTU

Deaminované gliadinové peptidové epitopy jsou navázány na mikrotitrační destičku. V případě, že jsou ve zředěném séru nebo plazmě obsaženy protilátky proti antigenu naváží se na antigen. Při promytí mikrotitrační destičky se odstraní nespecifické složky v séru. Křenuv peroxidáza (HRP) konjugovaná s anti-human IgG detekuje navázané protilátky za tvorby konjugát/protilátka/antigen komplexu. Při promytí mikrotitrační destičky se odstraní nenavázaný konjugát. Po přidání enzymového substrátu se přítomnost navázaného konjugátu projeví modrou barvou. Po přidavku kyseliny se reakce zastaví a vznikne konečné žluté zbarvení. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci IgG protilátek ve vzorku a lze změřit fotometricky při 450nm.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Normální hodnoty

Studii vzorků séra zdravých dárců bylo stanoveno toto rozmezí:

| | Anti-DGP IgG [U/ml] |
|-----------|---------------------|
| normální: | < 10 |
| zvýšené: | ≥ 10 |

Pozitivní výsledky musí být verifikovány až s posouzením celkového zdravotního stavu pacienta. Stejně tak i každé rozhodnutí o terapii by mělo být přijímáno individuálně. Doporučujeme každé laboratoři stanovit si vlastní rozmezí normálních a patologických hodnot DGP v séru.

ODBĚR A MANIPULACE SE VZORKEM

- Odeberte plnou krev za použití odpovídajících technik, abyste předešli hemolýze.
- Po vysrážení oddělte sérum odstředěním.
- Sérum by pro test mělo být čisté bez hemolýzy.
- Skladujte ve 2°- 8°C maximálně 5 dní. Pro déletrvajícím skladování zamrazte - 20°C maximálně na 6 měsíců.
- Nezmrazujte a nerozmrazujte opakovaně (ztráta aktivity protilátek).
- Testování teplem inaktivovaných sér se nedoporučuje.

PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ

- Všechny součásti soupravy jsou určeny výhradně k i vitro diagnostickým účelům.
- Nezaměňujte složky soupravy z různých šarží.
- Všechny složky lidského původu byly testovány na HBsAg, HCV, HIV-1 a 2 shledány negativními postupy doporučenými FDA. Přesto je se všemi deriváty lidské krve a se vzorky pacientů třeba zacházet jako s látkami potencionálně infekčními. Dodržujte SLP ve skladování, rozplňování, manipulaci s těmito materiály.
- Nepotřísněte se TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine). Pokud si potřísníte kůži, omyjte postižené místo vodou a mýdlem.
- Stopovací roztok obsahuje kyselinu. Při potřísnění omyjte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.
- Některé součásti soupravy (kontroly, ředící pufr, promývací roztok) obsahují azid sodný jako konzervant. Azid sodná (NaN_3) je vysoce toxický a reaktivní v čisté formě. V produktu je v koncentraci 0,09%, proto není nebezpečný. I přes to, že není produkt klasifikován jako nebezpečný, výrazně doporučujeme přesně dodržovat správnou laboratorní praxi (viz 8., 9. 10.).
- Některé součásti soupravy obsahují Proclin 150 jako konzervant. V případě likvidace činidel s obsahem Proclinu 300, propláchněte odpadní potrubí velkým množstvím vody ke zředění složek pod aktivní koncentraci.
- Používejte jednorázové rukavice při zacházení se vzorky nebo činidly. Po použití si umyjte ruce
- Nepipetujte ústy.

- Nejezte, nepijte, nekuřte, nepoužívejte make-up na pracovním místě.
- Vyhněte se kontaktu pufrovaného roztoku peroxidu a snadno oxidujících materiálů, v extrémních teplotách může dojít k samovolnému hoření.
- Při likvidaci laboratorního odpadu dodržujte platné předpisy.

Dodržujte postupy, abyste zajistily kontrolu kvality v zdravotnických laboratořích. Používejte kontroly a/nebo pool séra. Při zacházení s komponenty soupravy a vzorky sér dodržujte stanovená nařízení.

POZNÁMKY K POSTUPU

1. Nepoužívejte po uplynutí data použitelnosti.
2. Nepoužívejte komponenty z jiných šarží.
3. Před provedením testu je nutné všechny komponenty vytemperovat na laboratorní teplotu (20-28°C).
4. Před stanovením si připravte všechna ředění. Po započetí testu musí být postup dodržen bez přerušení.
5. Postupujte dle předepsaného postupu.
6. Používejte pouze čerstvě naředěné vzorky.
7. Všechny činidla a vzorky pipetujte na dno jamky.
8. K zabránění kontaminace vyměňujte špičky pipety pro každé činidlo a vzorky.
9. Správná promývací technika je důležitá. Je důležité odstranit kapky promývacího roztoku k zajištění správných výsledků.
10. Ve všech krocích je důležité časování. Začátek inkubace je vždy po rozplnění do všech jamek.
11. Kontrolní séra nebo pooly by měly být rutinně stanoveny jako neznámé vzorky ke kontrole stanovení
12. Mikrotitrační destička je pouze na jedno použití.

Všechny kontroly mají uvedené koncentrace na každé lahvičce. Uvedené koncentrace můžete požit k sestrojení kalibrační křivky a získání koncentrací patientských vzorků.

PŘÍPRAVA ČINIDEL

Příprava ředícího pufru

Naředěte obsah každé lahvičky koncentrátu (5x) ředícího pufru destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 100 ml těsně před použitím. Skladujte v lednici: stabilní při 2-8 °C po dobu 30 dní od přípravy.

Příprava promývacího roztoku

Naředěte obsah každé lahvičky koncentrátu (50x) promývacího roztoku destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 1000 ml těsně před použitím. Skladujte v lednici: stabilní při 2-8 °C po dobu 30 dní od přípravy.

Příprava vzorků

Naředěte před stanovením všechny vzorky 1:100 ředícím pufrem. 10 µl vzorku + 990 µl ředícího roztoku v polystyrénové zkumavce. Dobře promíchejte. Kontroly jsou

k přímému použití, nemusí se ředit.

PROVEDENÍ TESTU

- Step 1 Vyjměte odpovídající počet jamek ze sáčku, vraťte nepoužité a dobře uzavřené vraťte do lednice. Jamky opatrně vložte do nosiče.
- Step 2 Pipetujte duplicitně **100 µl** kalibrátorů, kontrol a předředených vzorků do jamek.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|----|----|----|-----|---|---|
| A | SA | SE | P1 | P5 | | |
| B | SA | SE | P1 | P5 | | |
| C | SB | SF | P2 | P.. | | |
| D | SB | SF | P2 | P.. | | |
| E | SC | C1 | P3 | | | |
| F | SC | C1 | P3 | | | |
| G | SD | C2 | P4 | | | |
| H | SD | C2 | P4 | | | |

SA-SF: standardy A to F
 P1, P2...: pacientské vzorky 1, 2....
 C1: pozitivní kontrola
 C2: negativní kontrola

- Step 4 Inkubujte **30 minut** při laboratorní teplotě. (20-28°C)
- Step 5 Vylijte obsah jamek a promyjte **3x 300 µl** promývacího roztoku.
- Step 6 Pipetujte do jamek **100 µl Enzym konjugátu**
- Step 7 Inkubujte **15 minut** v laboratorní teplotě.
- Step 8 Vylijte obsah jamek a promyjte **3x 300 µl** promývacího roztoku
- Step 9 Pipetujte **100 µl Substrátu** do všech jamek ve stejném pořadí a časování jako enzym konjugát
- Step 10 Inkubujte **15 minut** v laboratorní teplotě.
- Step 11 Přidejte **100 µl Stopovacího roztoku** do všech jamek ve stejném pořadí a časování jako substrát. Nechte 5 minut odstát
- Step 12 Odečtěte absorbanci při **450 nm** nebo při **450/600-690 nm**.
- Vytvořené zbarvení je stabilní 30 minut. Optickou hustou odečtěte během této doby.**

VYHODNOCENÍ TESTU

Kontrola Kvality

Test je platný pouze pro OD při 450 nm, že pozitivní kontrolu (1), pozitivní kontrolu (2) a kalibrátory A-F splňují kritéria uvedená v Quality Control Certificate přiloženém v každé soupravě! V případě, že test nesplňuje některá kritéria, je neplatný a musí být opakován.

Výpočet výsledků

Pro Anti-DGP ELISA je doporučený 4-Parameter-Fit v lin-log souřadnicích, je doporučeno pro OD a koncentrace.

Doporučená tvorba grafu Lin-Log

Nejdříve vypočítejte průměrnou OD pro každý kalibrátor. Použijte lin-log graf a vynesete průměrné hodnoty OD a koncentrace kalibrátorů. Zakreslete vhodnou křivku. Body pro kalibrátory mohou být také spojeny přímo. Koncentrace neznámých vzorků stanovte z kalibrační křivky interpolací.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS**HODNOCENÍ FUNKČNÍ ZPŮSOBILOSTI****Podobnost**

Vybraná séra obsahovala vysoké koncentrace IgG-protilátek, byla zředěna ředícím pufrem a stanovena soupravou Anti-DGP IgA. Stanovení vykazala linearitu i přes měřicí rozsah.

| DGP | vzorek | ředění | Naměřená [U/ml] | Očekávaná [U/ml] | N/O |
|-----|--------|--------|-----------------|------------------|------|
| IgG | 1 | 1:100 | 55,3 | 55,3 | 100% |
| | | 1:200 | 27,0 | 27,7 | 98% |
| | | 1:400 | 13,9 | 13,8 | 101% |
| | | 1:800 | 7,3 | 6,9 | 106% |
| | | 1:1600 | 3,4 | 3,5 | 98% |
| IgG | 2 | 1:100 | 69,1 | 69,1 | 100% |
| | | 1:200 | 37,8 | 34,6 | 109% |
| | | 1:400 | 20,2 | 17,3 | 117% |
| | | 1:800 | 9,8 | 8,6 | 113% |
| | | 1:1600 | 4,3 | 4,3 | 100% |

Sensitivita

nejnižší limit detekce Anti-DGP IgG byl stanoven na 1,0 U/ml.

Přesnost (Opakovatelnost)

Variační koeficient (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z 20 stanovení pro Intra-assay, pro Inter-assay byl spočítán z 5 měření po 2 opakováních:

| Intra-Assay | | |
|-------------|-------------|--------|
| Vzorek č. | Mean [U/ml] | CV [%] |
| 1 | 80,3 | 4,6 |
| 2 | 37,0 | 4,3 |
| 3 | 17,2 | 5,8 |
| 4 | 3,8 | 4,8 |

| Inter-Assay | | |
|-------------|-------------|--------|
| Vzorek č. | Mean [U/ml] | CV [%] |
| 1 | 88,0 | 2,7 |
| 2 | 59,8 | 2,5 |
| 3 | 17,8 | 4,1 |
| 4 | 4,2 | 13,1 |

Specificita

Mikroplatíčko je potaženo vysoce čištěnými deaminovanými gliadinovými peptidy. Souprava detekuje protilátky proti deaminovaným gliadinovým peptidovým epitopům.

Kalibrace

Jelikož není dostupný mezinárodní referenční přípravek pro Anti-DGP IgG protilátky, stanovení je kalibrováno v relativních jednotkách.

LIMITACE TESTU

Anti-DGP IgG ELISA test napomáhá k diagnóze. Klinická diagnóza nemůže být stanovena pouze na základě výsledků tohoto testu, ale musí vycházet z celkového klinického obrazu a výsledků dalších testů.

INTERFERENCE

Bez interference hemolýzy (až do 1000 mg/dL), lipémie (až do 3 g/dL triacylglyceroly) nebo bilirubinu (až do 40 mg/dL). Nebyly zjištěny interference při použití antikoagulantů. Z praktických důvodů nepoužívejte vysoce hemolyzované a lipemické vzorky.

LITERATURA

1. Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:647-55.
2. Trier JS. Celiac sprue. *N Engl J Med.* 1991;325:1709-19. [Review]
3. Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, Ilonen J, Laurila K, Dahlbom I, Hansson T, Höpfl P, Knip M. Prevalence of Celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med.* 2003;348:2517-24.
4. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med.* 2003;163:286-92.
5. D'Amico MA, Holmes J, Stavropoulos SN, Frederick M, Levy J, DeFelice AR, Kazlow PG, Green PH. Presentation of pediatric celiac disease in the United States: prominent effect of breastfeeding. *Clin Pediatr (Phila).* 2005;44:249-58.
6. Green PH. The many faces of celiac disease: clinical presentation of celiac disease in the adult population. *Gastroenterology.* 2005;128(Suppl 1):S74-S78
7. Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med.* 2007;357:1731-43. [Review]
8. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology.* 1993;105:910-22. [Review]
9. Trocone R, Ferguson A. Anti-Gliadin antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991;12:150- 8. [Review]
10. Collin P, Mäki M, Keyriläinen O, Hällström O, Reunala T, Pasternack A. Selective IgA deficiency and coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:367-71
11. Bürgin-Wolff A, Gaze H, Hadziselimovic F, Huber H, Lentze MJ, Nusslé D, Reymond-Berthet C. Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. *Arch Dis Child.* 1991;66:941-7.

INKUBAČNÍ SCHÉMA

- 1** Pipet **100 µl** calibrator, control or patient sample
→ Incubate for **30 minutes** at room temperature
→ Discard the contents of the wells and wash 3 times with **300 µl** wash solution
- 2** Pipet **100 µl** enzyme conjugate
→ Incubate for **15 minutes** at room temperature
→ Discard the contents of the wells and wash 3 times with **300 µl** wash solution
- 3** Pipet **100 µl** substrate solution
→ Incubate for **15 minutes** at room temperature
- 4** Add **100 µl** stop solution
→ Leave untouched for **5 minutes**
→ Read at **450 nm**

ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay



DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch – technischen Produkten
und Laborinstrumenten Gesellschaft m.b.H.
A – 2351 Wiener Neudorf, Österreich, IZ-NÖ Süd, Hondastrasse, Objekt M55
Phone: ++43 (0) 2236 660910-0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30, e-mail: office@dialab.at