www.dialab.cz

ELISA Enzyme **L**inked **I**mmuno**s**orbent **A**ssay

Microwell Method

Anti-Transglutamináza IgG

REF R01211

P ř í b a l o v ý l e t á k

Souprava pro kvantitativní stanovení IgG protilátek proti tkáňové transglutamináze (tTG) v lidském séru nebo plazmě

Microwell Method - 96 jamek

(12 proužků x 8 jamek potažených antigenem)

Úvod

Tkáňová transglutamináza (t-TG,TT) je cílem endomysiálních protilátek při onemocnění celiakií (CD). Celiakie je chronické onemocnění dětí i dospělých s genetickými predispozicemi. Toto onemocnění vzniká při příjmu potravy s obsahem glutenů (z pšenice). Toxickým agens je v tomto případě gliadin. Jeho absorpce vede k mukózním lézím v tenkém střevu, které vedou ke snížení absorpce živin.
U neléčeného onemocnění se zvyšuje nebezpečí vzniku intestinálního lymfomu nebo jiných gastrointestinálních nádorů. Mimoto je dlouhodobě neléčená celiakie příčinou vzniku dalších autoimunitních onemocnění.
Z těchto důvodů je dobré provádět screening populace na IgA a IgG protilátky ke tkáňové transglutamináze.
Diagnostika celiakie podle Evropské společnosti pro dětskou gastroenterologii a výživu doporučuje jednoduchou biopsii střeva zároveň s průkazem nejméně dvou z následujících tří IgA protilátek:

- IgG a IgA Anti-gliadin protilátky
- IgA anti- endomysální protilátky
- Anti-retikulin protilátky

Princip stanovení

Na mikrotitrační destičce je vázán rekombinantní antigen tkáňové transglutaminázy (tTG). Navázání protilátek přítomných ve vzorcích a kalibrátorech, vytvoření sendvičového komplexu a následná enzymová barevná reakce probíhají v následujících fázích:

1. Protilátky přítomné v pozitivních vzorcích se navážou na antigen nanesený na povrchu jamky a vytvoří komplex protilátky a antigenu.
2. Po inkubaci se při prvním promytí odstraní nenavázané a nespecificky navázané molekuly. Poté se přidá konjugát, který se naváže na komplex protilátky a antigenu.
3. Po inkubaci se při druhém promytí odstraní nenavázaný konjugát
4. Po přidání substrátu dojde k hydrolýze a vzniku zbarvení.
5. Přidání kyseliny zastaví reakci, vytvoří se žlutý finální produkt. Intenzita žlutého zbarvení je úměrná koncentraci protilátky ve vzorku. Změří se při 450 nm.

Složení soupravy:

Microwell plate	Mikrotitrační destička	Σ 96	Dělitelná mikrotitrační destička. K přímému použití.
Calibrator A-F	Kalibrátory A-F	6x 1,5 ml	Koncentrace 0-5-10-25-75-200 U/ml. Sérum/pufrová matice (PBS,BSA, detergenty, NaN3 0,09%). K přímému použití.
Positive Control Negative Control	Kontroly Pozitivní-Negativní	2x 1,5 ml	Sérum/pufrová matice (PBS,BSA, detergenty, NaN3 0,09%). Koncentrace uvedena v certifikátu. K přímému použití.
Sample Buffer	Ředící roztok	15 ml	Ředící roztok pro vzorky. Obsahuje PBS,BSA, detergenty, NaN3 0,09%. **5 x koncentrovaný**
Enzyme Conjugate	Enzym konjugát	15 ml	HRP konjugát. Obsahuje anti-h protilátky k IgG. Obsahuje PBS,BSA, detergenty, Proclin 0,05%. K přímému použití.
Substrate TMB	TMB Substrát	15 ml	3,3´,5,5´-tetrametylbenzidin K přímému použití.
Stop Solution	Stopovací roztok	15 ml	Roztok kyseliny. K přímému použití.
Wash Buffer	Promývací roztok	20 ml	Obsahuje Tris, detergent, azid sodný NaN3. **50x koncentrovaný**

Materiál a pomůcky

- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Odměrný válec
- Makro- a mikropipety v rozsahu 10 – 1000 µl.
- Multikanálová mikropipeta.
- Microplate Reader – jakýkoli fotometr určený pro měření absorbance mikrotitračních destiček při vlnové délce 450 nm, jako referenční filtr je možné použít filtr 600 – 650 nm.
- Automatická promývačka mikrotitračních destiček s možností rozplňování objemu 300 µl.

Odběr, příprava a uchovávání vzorků

- Při odběru dodržujte schválené postupy
- Po odběru nechte krev srazit a odstředěním získejte sérum
- Nepoužívejte vzorky hemolytické, lipemické a ikterické.
- Vzorky pro stanovení je možné uchovávat při teplotě 2-8 °C až po dobu 5 dnů. Pro delší skladování doporučujeme zmrazení vzorku na – 20 °C.
- Nezmrazujte a nerozmrazujte opakovaně.
- Nedoporučujeme používat tepelně inaktivovaná séra.

Skladování a stabilita reagencií

- Soupravu skladujte na tmavém místě při teplotě 2 – 8 °C.
- Během skladování a manipulace nevystavujte činidla horku, slunečnímu záření nebo intenzivnímu světlu.
- Zbylé stripy mikrotitrační destičky musí být uchovávány při teplotě 2-8 °C v dobře uzavřeném obalu s vysoušedlem.
- Pokud jsou uchovávány při teplotě 2-8 °C, jsou komponenty stabilní po dobu použitelnosti.
- Pokud jsou uchovávány při teplotě 2-8 °C, jsou komponenty stabilní po dobu 30 dní od otevření lahvičky.

Příprava pufru pro ředění vzorku

Obsah lahvičky nařeďte destilovanou vodou na konečný objem 100 ml. Při teplotě 2-8 °C je takto připravený roztok stabilní po dobu 30 dní.

Příprava promývacího roztoku

Obsah lahvičky nařeďte destilovanou vodou na konečný objem 1000 ml. Při teplotě 2-8 °C je takto připravený roztok stabilní po dobu 30 dní.

Poznámky k pracovnímu postupu

- Nepoužívejte komponenty po uplynutí doby jejich použitelnosti.
- Nepoužívejte komponenty z různých šarží nebo typů souprav.
- Před započetím práce vytemperujte všechny složky na laboratorní teplotu (20 – 28°C).
- Před započetím práce si připravte vše potřebné, po jejím zahájení je nutné provádět jednotlivé úkony bez přerušení.
- Pipetování lze provádět v dubletu. Eliminují se tak chyby způsobené špatným pipetováním.
- Jednotlivé kroky testu provádějte ve stanoveném pořadí.
- Používejte vždy čerstvě naředěné vzorky.
- Všechny reagencie a vzorky pipetujte na dno jamek.
- Na každý reagent používejte čistou špičku. Zabráníte tak křížové kontaminaci.
- Správné vymytí a následné odstranění promývacího roztoku je nezbytným předpokladem správného výsledku.
- Věnujte pozornost správnému načasování jednotlivých kroků a inkubací.
- Mikrotitrační destičku nepoužívejte opakovaně

Upozornění a bezpečnostní opatření

- Všechny reagencie jsou určeny pouze pro in-vitro diagnostické použití.
- Všechny součásti soupravy, které jsou lidského původu, byly testovány metodami schválenými FDA, a v těchto testech byly shledány negativními na HBsAg,HCV,HIV-1 a 2 a HTLV-1. Protože žádné testování nemůže zcela vyloučit biologickou bezpečnost materiálů lidského původu, je třeba při manipulaci s tímto materiálem dodržovat přiměřená bezpečnostní opatření.
- Hovězí albumin použitý pro přípravu byl označen jako negativní na BSE.
- V případě potřísnění kůže substrátem (TMB), omýt zasažené místo vodou a mýdlem.
- Stopovací roztok obsahuje kyselinu chlorovodíkovou. Při potřísnění omýt zasažené místo vodou, v případě nutnosti vyhledat lékařskou pomoc.
- Kontrola, kalibrátory, ředící a promývací roztok obsahují 0,09% azidu sodného. Tako koncentrace je klasifikována jako bezpečná.
- Enzym konjugát obsahuje 0,05% Proclinu 300. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.

Při manipulaci s reagenciemi, kontrolami a vzorky séra dodržujte platná doporučení pro bezpečnou práci v laboratoři a SLP.

- První pomoc: V případě kontaktu s pokožkou ihned opláchněte vodou a mýdlem. Sejměte kontaminovaný oděv a boty a před dalším použitím vyčistěte. Při vniknutí do očí důkladně oplachujte pod tekoucí vodou minimálně 10 minut. Podle potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
- Ochranné pomůcky a nouzové postupy: Dodržujte směrnice pro bezpečnou práci v laboratoři. Zabraňte potřísnění nebo vniknutí reagencií do očí. Nepipetujte ústy. V laboratoři nejezte, nepijte, nekuřte a nenanášejte make-up. Při vylití nasajte inertním materiálem a zlikvidujte v souladu s předpisy.
- Expoziční limity, ochrana osob: Při práci používejte ochranné rukavice z nitrilové pryže nebo přírodního latexu. Používejte ochranné brýle. Při manipulaci podle zamýšleného účelu použití nejsou známy nebezpečné účinky.
- Situace, kterým je třeba předcházet: Substrát je citlivý na světlo, skladujte na tmavém místě.
- Při likvidaci laboratorního odpadu dodržujte platné předpisy.

Dodržujte směrnice řízení jakosti v analytických laboratořích.

Příprava reagencií:

WASH

Koncentrát nařeďte na celkový objem 1000 ml destilovanou nebo deionizovanou vodou.

DILUENT

Koncentrát nařeďte na celkový objem 100 ml destilovanou nebo deionizovanou vodou.

Nařeďte vzorky pacientů 1:100 v připraveném ředícím roztoku:
990 µl předředěného pufru + 10 µl vzorku. Promíchejte.
Kalibrátory a kontroly jsou určeny k přímému použití, neředí se.

Postup:

Připravte si dostačující množství janek.

1. Napipetujte 100 µl kalibrátorů, kontrol a předředěných vzorků do příslušných jamek (v dubletu).

–	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	CA	CA	V1	V1								
b	CB	CB	V2	V2								
c	CC	CC										
d	CD	CD										
e	CE	CE										
f	CF	CF										
g	PC	PC										
h	PN	PN										

Cx – kalibrátory
PC-PN- kontroly pozitivní, negativní
Vx - vzorky

Inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě (20-28 ^{o}C).
Obsah jamek vylijte a 3 x vypláchněte 300 µl promývacího roztoku.

2. Do každé jamky napipetujte 100 µl konjugátu a inkubujte 15 minut při laboratorní teplotě.
   Obsah jamek vylijte a 3 x vypláchněte 300 µl promývacího roztoku.
3. Do každé jamky napipetujte 100 µl substrátu a inkubujte 15 minut při laboratorní teplotě.
4. Reakci ukončete přidáním 100 µl stopovacího roztoku. Dbejte na to, abyste roztok přidávali ve stejném pořadí jako substrát.
   Absorbanci odečtěte po cca 5 minutách při 450/600–690 nm. Neodečítejte po více než 30 min.

Validita testu

Test je validní, pokud OD při 450 nm pro kontroly a kalibrátory odpovídá rozsahům uvedeným v Certifikátu, který přiložen u každé soupravy. Pokud tomu tak není, je třeba test opakovat.

Interpretace výsledků

1. Vypočtěte průměrné hodnoty absorbancí jednotlivých kalibrátorů a vzorků a odečtěte průměrnou hodnotu absorbance nulového kalibrátoru.
2. Vyneste body do grafu s lin-log osami a z takto získané křivky odečtěte koncentraci tTG ve vzorcích.

Kalibrace:

Protože není k dispozici žádný mezinárodní standard, byla souprava kalibrována v dohodnutých relativních jednotkách.

Analytické parametry stanovení:

Rozsah měření 0 – 200 U/ml

Předpokládané hodnoty: Ve studii se zdravými dárci byla stanovena cut-off 10 U/ml.

Interpretace výsledků:
Negativní < 10 U/ml
Pozitivní ≥ 10 U/ml

Linearita:
Vzorky pacientů s vysokou hladinou protilátky byly sériově zředěny a testovány. Koncentrace byly odečteny z kalibrační křivky.

Vzorek	Ředění	Pozorovaná U/ml	Očekávaná U/ml	P/O [%]
1	1:100	188.0	188.0	100
.	1:200	101.7	94.0	108
.	1:400	48.4	47.0	103
.	1:800	24.1	23.5	103
.	1:1600	10.9	11.8	93
2	1:100	196.0	196.0	100
.	1:200	97.2	98.0	99
.	1:400	49.4	49.0	101
.	1:800	24.8	24.5	101
.	1:1600	11.9	12.3	97

Limit detekce: 1 U/ml

Přesnost:

Intra-assay- 24 opakování tří různých vzorků

Inter-assay- tři různé vzorky v šesti opakováních v pěti různých testech

Intra-Assay		
Vzorek	Průměr U/ml	CV %
1	22.1	3.0
2	39.9	3.8
3	69.2	4.3

Inter-Assay		
Vzorek	Průměr U/ml	CV %
1	23.3	8.1
2	40.1	4.7
3	71.3	7.0

Interference:
Nebyla pozorována interference se séry, která byla hemolytická (do 1000 mg/dl), lipemická (do 3 g/dl triglyceridů) nebo s obsahem bilirubinu až do 40 mg/dl. Nebyly pozorovány interference s antikoagulačními činidly (EDTA, heparin, citrát). Přesto doporučujeme vysoce hemolyzované nebo lipemické vzorky netestovat.

Studie na populaci:

Study population	n	n Pos	%
Coeliac disease	35	23	65.7
Normal human sera	8	8	100.0
	90	0	0.0

Anti-t-TG

	Klinická diagnóza Pos	Neg	
Pos	31	0	
Neg	12	90	
	43	90	133

senitivität	72.1 %
specificita	100.0 %
diagnostická efektivita	91.0 %

Omezení testu:

Test je určen pro in-vitro diagnostické použití. Klinická diagnóza nemůže být stanovena pouze na základě výsledků tohoto testu, ale musí vycházet z celkového klinického obrazu a výsledků dalších testů. Každá laboratoř si podle ISO15189 nebo jiné vhodné metodiky musí stanovit vlastní rozmezí normálních a abnormálních hodnot.

Literatura:

1. Alessio M, Tonutti E, Brusca I, Radice A, Licini L, Sonzogni A, Florena A, Schiaffino E, Marus W, Sulfaro S, Villalta D: Correlation between IgA tissue transglutaminase antibody ratio and histological finding in celiac disease: A multicentre study. J Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2011.
2. Cummins AG, Roberts-Thomson IC: Prevalence of celiac disease in the Asia-Pacific region. J Gastroenterol. Hepatol. 2009, 24:1347-1351.
3. Giersiepen K, Lelgemann M, Stuhldreher N, Ronfani L, Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR: Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary of an evidence report. J Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2012, 54:229-241.
4. Green PH, Cellier C: Celiac disease. N. Engl. J Med. 2007, 357:1731-1743.
5. Gupta R, Reddy DN, Makharia GK, Sood A, Ramakrishna BS, Yachha SK, Thapa BR, Banerjee R, Anuradha S, Dutta U, Puri AS, Jain AK, Mulder CJ, Kumar A, Boindala S: Indian task force for celiac disease: current status. World J Gastroenterol. 2009, 15:6028-6033.
6. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Maki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP: European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. J Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2012, 54:136-160.
7. Mahadov S, Green PH: Celiac disease: a challenge for all physicians. Gastroenterol. Hepatol.(N Y) 2011, 7:554 -556.
8. Marietta EV, Rashtak S, Murray JA: Correlation analysis of celiac sprue tissue transglutaminase and deamidated gliadin IgG/IgA. World J Gastroenterol. 2009, 15:845-848.
9. Murray JA: Serodiagnosis of celiac disease. Clin. Lab. Med. 1997, 17:445-464.
10. Rubio-Tapia A, Murray JA: Celiac disease. Curr. Opin. Gastroenterol. 2010, 26:116-122.
11. Telega G, Bennet TR, Werlin S: Emerging new clinical patterns in the presentation of celiac disease. Arch. Pediatr. Adolesc. Med 2008, 162:164-168.
12. Tjon JM, van BJ, Koning F: Celiac disease: how complicated can it get? Immunogenetics 2010, 62:641-651.
13. van der Windt DA, Jellema P, Mulder CJ, Kneepkens CM, van der Horst HE: Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review. JAMA 2010, 303:1738-1746.
14. Villalta D, Tonutti E, Prause C, Koletzko S, Uhlig HH, Vermeersch P, Bossuyt X, Stern M, Laass MW, Ellis JH, Ciclitira PJ, Richter T, Daehnrich C, Schlumberger W, Mothes T: IgG antibodies against deamidated gliadin peptides for diagnosis of celiac disease in patients with IgA deficiency. Clin. Chem. 2010, 56:464-468.

DIALAB spol, s r.o., Náměstí Osvoboditelů 1,
153 00 Praha 5 – Radotín
IČO: 14889200
Tel./Fax. 257910260, 257910263
e-mail: office@dialab.cz URL: www.dialab.cz