



ImmuLisa™ Anti-human Tissue Tranglutaminase Antibody (hu tTG) IgA ELISA

For *in vitro* diagnostic use **IVD**

CLIA Complexity: High
CDC Analyte Identification Code: 0546
CDC Test System Identification Code: 28569

PRODUCT INSERT

Catalog No. 1144

96 Determinations

INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and semi-quantitation of anti-human Tissue Transglutaminase IgA antibodies in human serum to aid in the diagnosis of patients with celiac disease and dermatitis herpetiformis.

SUMMARY AND EXPLANATION

Celiac Disease (CD) is an autoimmune gastrointestinal disorder that may occur in genetically susceptible individuals triggered by the ingestion of gluten-containing grains such as wheat, barley and rye. Of the many autoimmune disorders, CD represents one of the few where the etiological agent is known and the disease subsides and goes in remission once the etiological agent is withdrawn from the diet.

CD is characterized by malabsorption resulting from inflammatory injury to the small intestinal mucosa and, when prolonged, can cause malnutrition. The classical symptoms of CD include diarrhea, weight loss and malnutrition.

Only a small percentage of patients with CD presents with classical symptoms. Consequently, the clinical spectrum of CD has grown much broader than in the past to include patients that do not present with classical symptoms. It is not uncommon for the initial symptoms to be non-gastrointestinal or for gastrointestinal symptoms, if present, to be mild or intermittent.

Some common non-gastrointestinal manifestations include short stature, iron and folate deficiency, anemia, bone loss, aphthous stomatitis, arthralgia, dental enamel defects, etc. The need to examine a wider range of clinical presentation has led to greater numbers of individuals diagnosed with CD later in life than ever before. Adults may present with iron deficiency, macrocytic anemia and hypocalcaemia.

Studies have found the prevalence of CD to be highly variable from population to population.¹ The true prevalence has been difficult to ascertain. Disparate criteria used in diagnosis of CD are often the cause. If clinical criteria alone are used in determining prevalence, the incidence of CD is much lower as compared with incidence established by serological methods.^{1,2} Using serological methods, the incidence of CD in the general population is approximately one in 200.

Diagnosis of CD based on clinical criteria thus can be misleading and may lead to serious delays in proper diagnosis. Frequently, delays in diagnosis extend 10-13 years from the first clinical presentation of symptoms.

Failure to diagnose CD early on may predispose an individual to long-term complications such as splenic atrophy and intestinal lymphoma. The incidence of lymphoma arising in the context of CD is difficult to ascertain. One study has shown incidence of lymphoma involving the gastrointestinal (GI) tract in patients with CD to range from 3.6 percent to 40 percent.³ In another recent study,⁴ CD is associated with significantly elevated risk for intestinal

lymphoma, especially for non-Hodgkin's. A gluten-free diet (GFD) normalizes the mucosa and helps reduce the malignant potential.

Histological examination of the small intestinal biopsy remains the gold standard for diagnosing CD, but it has its own limitations. These include some patients with latent or even active CD that may have normal histopathology.⁵

The revised European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGHAN) criteria include only a single biopsy with clear-cut remission of clinical symptoms on GFD⁶. Positive serology at the time of diagnosis with disappearance on GFD contributes to the diagnosis. The various serological tests employed in the work-up of patients suspected to have CD include anti-gliadin antibody (AGA), anti-endomysial antibody (EMA), anti-reticulin antibody (ARA) and anti-tissue transglutaminase (tTG) antibody tests. Antibodies to gliadin and tTG are detected by ELISA, whereas endomysium and reticulin antibodies are detected by indirect immunofluorescence. EMA are very specific indicators of CD. However, the EMA test is an immunohistochemical method that requires experience in reading immunofluorescence reactions. Rosario et al⁷ concludes that "EmA-IgA is 100 percent sensitive and specific in active, untreated IgA-sufficient CD patients when performed by an established laboratory."

Since identification of tTG as the endomysial antigen, ELISA methods have been described for detecting antibodies in the sera of patients with CD. The advantage of the anti-tTG antibody assay is that it is automatable and less subjective than EMA. For this reason, many laboratories have opted to use the tTG antibody method as the screening method. In these laboratories, it may be the only assay used for detection of CD cases. In various studies on the efficacy of the tTG antibody method for screening for CD, the specificity and sensitivity of this method has been found to range from 90 percent to 95 percent.⁸ Human tTG has been described to improve the sensitivity of the tTG antibody assay for CD.

PRINCIPLES OF PROCEDURES

Recombinant human Tissue Transglutaminase antigen is bound to the wells of a polystyrene microwell plate followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Controls, calibrators and diluted patient sera are added to separate wells, allowing any anti-tTG antibodies present to bind to the immobilized antigen. Unbound sample is washed away and an enzyme labeled anti-human IgA conjugate is added to each well. These enzyme conjugated antibodies bind specifically to the human immunoglobulin of the IgA class. After washing away any unbound conjugate, specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells. After stopping the enzymatic reaction, the intensity of color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in ELISA units per milliliter (EU/ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell strips are for one time use only.

Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials⁹. **WARNING** - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from IMMCO DIAGNOSTICS.

Use good laboratory techniques to minimize microbial and chemical contamination.

Do not use after expiration date.

Materials Provided

ImmuLisa™ IgA-tTG ELISA REF 1144

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	MICROPLATE tTG	Microplate with individual breakaway microwells coated with hu tTG antigen.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A tTG * †	Ready to use Calibrator A (<i>green cap</i>). Human serum containing antibodies to tTG.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B tTG * †	Ready to use Calibrator B (<i>violet cap</i>). Human serum containing antibodies to tTG.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C tTG * †	Ready to use Calibrator C (<i>blue cap</i>). Human serum containing antibodies to tTG.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D tTG * †	Ready to use Calibrator D (<i>yellow cap</i>). Human serum containing antibodies to tTG.
1 x 1.5 ml	CONTROL + tTG * †	Ready to use Positive Control (<i>red cap</i>). Contains human serum positive for tTG.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use Negative Control (<i>white cap</i>). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL *	Ready to use Serum Diluent . Color coded blue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light.
1 x 12 ml	STOP	Ready to use Stop Solution .
2	BUF WASH	Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.

* Contains < 0.1% NaN₃

Materials Required But Not Provided

- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Deionized or distilled water
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Timer
- Absorbent paper
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

12. Incubate for 30 minutes at room temperature.
13. Add 100µL of Stop Solution to each well. Maintain the same sequence and timing of Stop Solution addition as was used for the Enzyme Substrate. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm within one hour of stopping the reaction.
14. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm using a single or dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. Calibrator A should have an absorbance reading ≥ 1.0 , otherwise the test must be repeated. The negative control must be <20 EU/ml. If the test is run in duplicate, take the mean of the two readings to determine the concentration of anti-hu tTG antibodies. While performing qualitative determinations, the optical density of Calibrator D must be greater than that of the negative control and less than the positive control. For semi-quantitative determinations, the positive control must give values in the range stated on the vial. We recommend borderline samples be tested with a fresh sample taken at a later date to ensure accuracy.

RESULTS

Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{EU/ml of Calibrator D} = \text{EU/ml Test Sample}$$

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value. See Figure 1 at the end of this document for a sample standard curve.

Calibrator

The calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each test. Patient specimens containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such specimens should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

Interpretation

The following information serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values.

Anti-tTG Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/ Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/ Indeterminado/Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The Immulisa™ anti-tTG IgA assay should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. The method should be used for testing human serum samples only. Results obtained serve only as an aid in the diagnosis and should not be interpreted as

diagnostic in themselves. In IgA deficient CD patients anti-tTG may be negative.

EXPECTED VALUES

The expected values in a normal population are negative (<20 EU/ml for adults and children). However, it has been determined that some apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive for IgA anti-tTG antibodies.

The incidence of anti-tTG antibodies has been studied by various investigators and the findings are summarized in Table 1 at the end of this document.

The incidence and the levels of anti-tTG antibodies is dependent upon the diet status. The levels of these antibodies decrease and eventually will become negative in patients with CD who are on a gluten-free diet. Similarly, the levels of these antibodies will increase or the anti-tTG antibodies become positive when patients with CD who were on a gluten-free diet ingests a gluten-containing diet ^{10, 11}.

As there are several antibody markers associated with CD, the algorithm in Figure 2 at the end of this document may serve as a guide in the interpretation of various serological markers for CD.

Some investigators have taken the approach presented in Figure 3 to establish a diagnosis of CD.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the ImmuLisa™ anti-tTG IgA Antibody ELISA was determined by comparing the results with:

- a) another commercially available anti-tTG IgA ELISA method and
- b) ImmuGlo™ anti-endomysial antibody immunofluorescence method.

Normal Range: The normal range was established by testing 64 serum samples from apparently healthy donors obtained from the Red Cross. The cutoff equals the average value + 3 STD of these samples.

Comparative Specificity and Sensitivity

- A. Endomysial Antibodies vs. ImmuLisa™ tTG IgA Antibody ELISA: A total of 274 samples were tested for EMA using ImmuGlo™ EMA kit and the results were compared with ImmuLisa anti-tTG IgA ELISA method. The results are summarized in Table 2:
- B. ImmuLisa™ anti-tTG ELISA vs. Another Commercial anti-tTG IgA ELISA Method: A total of 74 samples were tested on ImmuLisa™ anti-tTG IgA antibody kit and another commercially available anti-tTG IgA kit. The results appear in Table 3:
- C. Cross Reactivity: A total of 65 disease controls from autoimmune vesiculo-bullous cases such as pemphigus were tested. None were found positive.

Precision:

Samples with known concentrations of anti-tTG IgA were assayed in 10 replicates over a period of two weeks. Intra-and inter-assay coefficient of variation (CV) were calculated. See Table 4.

Recovery:

Samples with known anti-tTG IgA concentrations were mixed with appropriate dilutions of another positive sample with known amounts of anti-tTG IgA. Anti-tTG IgA antibody levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery calculated. The results appear in Table 5.



ImmuLisa™ Anti-Transglutaminase de Tissu (tTG) Anticorps IgA ELISA

IVD

REF

1144

IgA-tTG

96 Determinations

ImmuLisa™ anti-tTG IgA ELISA est un test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) pour la détection semi-quantitative des anticorps IgA contre tTG dans le sérum humain. La présence d'anticorps anti-tTG peut être utilisée dans le diagnostic de la maladie coeliaque (CD) et *dermatitis herpetiformis* (DH).

GENERALITES

La maladie coeliaque (CD) est un désordre gastro-intestinal autoimmunitaire qui peut se produire dans les individus génétiquement susceptibles déclenchés par l'ingestion des grains contenant du gluten tels que le blé, l'orge et le seigle. Des nombreux désordres autoimmunitaires, le CD représente un des peu où l'agent étiologique est connu et la maladie s'abaisse et entre dans la remise une fois que l'agent étiologique est retiré du régime.

Le CD est caractérisé par malabsorption résultant des dommages inflammatoires au petit mucosa intestinal et, une fois prolongé, peut causer la malnutrition. Les symptômes classiques du CD incluent la diarrhée, la perte de poids et la malnutrition.

Seulement un petit pourcentage des patients présentant le CD présente avec des symptômes classiques. En conséquence, le spectre clinique du CD s'est développé beaucoup plus large que dans le passé pour inclure les patients qui ne se présentent pas avec des symptômes classiques. Il n'est pas rare pour les symptômes initiaux soient non-gastro-intestinaux ou que les symptômes gastro-intestinaux, si présent, pour être doux ou intermittent.

Les études ont trouvé la prédominance du CD pour être fortement variables de la population à la population¹. Il a été difficile s'assurer la prédominance vraie. Les critères disparates utilisés dans le diagnostic du CD sont souvent la cause. Si seuls des critères cliniques sont employés en déterminant la prédominance, l'incidence du CD est beaucoup plus limitée par rapport à l'incidence établie par des méthodes sérologiques.^{1,2} Avec les méthodes sérologiques employantes, l'incidence du CD dans la population générale est approximativement une dans 200.

Le diagnostic du CD basé sur des critères cliniques peut être ainsi fallacieux et peut mener à sérieux retard dans le diagnostic approprié. Fréquemment, retard dans le diagnostic prolongent 10-13 ans de la première présentation clinique des symptômes.

Le manque de diagnostiquer le CD dès l'abord peut prédisposer un individu aux complications à long terme telles que l'atrophie splénique et le lymphome intestinal. Il est difficile s'assurer l'incidence du lymphome surgissant dans le contexte du CD. Une étude a montré l'incidence du lymphome impliquant la région gastro-intestinale dans les patients du CD pour s'étendre de 3.6% à 40%.³ Dans une autre étude récente, le CD est associé au risque sensiblement élevé pour le lymphome intestinal, particulièrement pour les non-Hodgkin's⁴. Un régime gluten-libre (GFD) normalise la mucosa et les aides réduisent le potentiel malin.

L'examen histologique de la petite biopsie intestinale demeure le étalon or or pour diagnostiquer le CD, mais il a ses propres limitations. Celles-ci incluent quelques patients présentant le CD latent ou même actif qui peut avoir l'histopathologie normale.⁵

L'ESPGHAN incluent seulement une biopsie simple avec la remise définie des symptômes

cliniques sur GFD⁶. La sérologie positive à l'heure du diagnostic avec la disparition sur GFD contribue au diagnostic. Les divers essais sérologiques utilisés incluent aussi l'anticorps anti-gliadine (AGA), l'anticorps anti-endomysial (EMA), l'anticorps anti-reticuline (ARA) et l'anticorps anti-tissu transglutaminase (tTG). Des anticorps à la gliadine et au tTG sont détectés par ELISA, tandis que des anticorps endomysium et reticuline sont détectés par l'immunofluorescence indirecte. EMA sont les indicateurs très spécifiques du CD. Cependant, l'essai EMA est une méthode immuno-histochimique qui exige l'expérience des réactions d'immunofluorescence de lecture. Rosario et autres conclut que "EmA-IgA est de 100 pour cent de sensible et détail dans les patients IgA-suffisants actifs et non traités de CD une fois exécuté par un laboratoire établi." ⁷

Depuis l'identification du tTG comme antigène endomysial, des méthodes d'ELISA ont été décrites pour détecter des anticorps dans les sérums des patients présentant le CD. L'avantage de l'analyse d'anticorps anti-tTG est qu'il est automatisable et moins subjectif qu'EMA. Pour cette raison, beaucoup de laboratoires ont choisis d'employer la méthode d'anticorps tTG comme méthode de criblage. Dans ces laboratoires, ce peut être la seule analyse utilisée pour la détection des cas de CD. Dans diverses études sur l'efficacité de la méthode d'anticorps tTG pour examiner pour le CD, la spécificité et la sensibilité de cette méthode s'est avérée pour s'étendre de 90% à 95%. Le tTG humain a été décrit pour améliorer la sensibilité de l'analyse d'anticorps tTG pour le CD. ⁸

PRINCIPE DU TEST

L'antigène tTG recombinant est fixé sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène. La plaque est bloquée pour réduire l'attache non spécifique. Les contrôles, les étalons et les sérums de dilués patients sont ajoutés dans différents puits. Une étape d'incubation permet la liaison entre les anticorps anti-tTG présents dans le sérum et l'antigène immobilisé dans le puits. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique anti- IgA humaine est alors ajouté dans chaque puits pour révéler les autoanticorps du patient. Ces anticorps lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine de la classe IgA. Après une étape d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat enzymatique (pNPP) suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Après avoir arrêté la production enzymatique de produit coloré, la présence ou l'absence d'anticorps anti-tTG sera déterminée en comparant la densité optique de l'échantillon à celle d'une courbe d'étalonnage à quatre points. Les résultats sont enregistrés de façon semi-quantitative en unités ELISA (EU/ml).

CONTENU DU COFFRET

Conditions de conservation

Conserver tous les réactifs du coffret entre 2-8°C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes.

N'employez pas si le réactif n'est pas clair.

Tampon de lavage: Ajoutez l'eau distillée ou désionisée pour le volume de 1L.

Micropuits: Employez une fois seulement.

Précautions

Tout le matériel d'origine humain utilisé pour la préparation des contrôles a été testé et trouvé négatif lors de la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-antigène de surface de l'Hépatite B et anti-Virus de l'Hépatite C à l'aide de tests approuvés par la FDA. Cependant, aucune méthode ne peut donner une garantie complète quant à l'absence de VIH, de VHB, du VHC ou d'autres agents infectieux. En conséquence, tous les sérums humains de contrôle doivent être manipulés avec les mêmes précautions que celles utilisées pour un matériel⁹ potentiellement infectieux. L'azide de sodium (NaN₃) est utilisé comme conservateur. NaN₃ est un poison et il est toxique en cas d'ingestion et de contact avec les yeux et la peau. Éviter de l'exposer aux bases, métaux ou autres composants, réagissant avec les acides. Après l'évacuation des réactifs, laver à grande eau afin d'éviter des dépôts dans les canalisations.

Toute substitution par d'autres réactifs que ceux fournis dans le coffret entraîne des

variations de résultats.

Employez les bonnes techniques de laboratoire pour réduire au minimum la contamination microbienne et chimique.

N'employez pas après date d'échéance.

Matériel fourni

ImmuLisa™ IgA-tTG ELISA REF 1144

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 déterminations chacune.

12 x 8	MICROPLATE tTG	barettes de 96 micropuits individuels, revêtue d'antigène cardiopiline
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A tTG * †	étalon A (chapeau vert), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B tTG * †	étalon B (chapeau violet), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C tTG * †	étalon C (chapeau bleu), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D tTG * †	étalon D (chapeau jaune), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	CONTROL + tTGtTG * †	contrôle positif (chapeau rouge), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	contrôle négatif (chapeau blanc), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	conjugué phos. alc. Rose codé par couleur.
1 x 60 ml	DIL *	diluant pour échantillons. Bleu codé par couleur.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	substrat enzymatique. Contient le pNPP. Protéger contre la lumière.
1 x 12 ml	STOP	solution d'arrêt
2	BUF WASH	tampon de lavage pour 1 litre/flacon

* Contient < 0.1% NaN₃

Autre matériel nécessaire non fourni

- Pipettes pour 5- 1000 µl
- Cônes jetables
- Tubes de 4ml pour la dilution de sérum
- Eau distillée ou déionisée
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm
- Bouteille pour le tampon de lavage
- Temporisateur
- Papier absorbant

Echantillons

Ce test doit être réalisé avec des sérums comme échantillons. Les sérums contaminés par des agents microbiens, prétraités par la chaleur ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés. Les sérums ou échantillons hémolysés ou lipémiques sont à éviter. Conserver les échantillons à température ambiante pas plus de 8 heures. Si le test ne peut pas être fait dans les 8 heures, conserver les échantillons à 2-8°C. Si le test ne s'effectue

pas dans les 48 heures ou si on doit envoyer les échantillons, les congeler à -20°C ou à plus basse température. Évitez la congélation répétée et le dégel.

MÉTHODE

Préparation du test

- Avant de commencer l'analyse a lu ces instructions soigneusement.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante ($20-26^{\circ}\text{C}$) pendant 30 minutes avant de les utiliser. Matériaux de retour au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des spécimens patients avant de commencer l'essai.
- **Remettre immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette en aluminium avec le dessiccant, fermer hermétiquement pour éviter toute condensation de vapeur d'eau.**
- Lavage: La bonne technique est critique. Une rondelle automatisée de plaque microtitration ELISA est recommandée.
- Utiliser une pipette multicanale capable de fournir 8 positions simultanément. Ceci expédie le processus et prévoit un temps plus uniforme d'incubation.
- La synchronisation soigneuse est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution du réactifs.

Exécution du test

1. **PORTER TOUS LES REACTIFS ET LES ECHANTILLONS À TEMPERATURE AMBIANTE ($20-26^{\circ}\text{C}$) AVANT DE LES UTILISER.**
2. Employer le page de protocole pour noter la position des spécimens dans le plaque microtitration. Il est dans de bons habitudes de laboratoire d'examiner des spécimens deux fois.
3. **Détermination qualitative :** employer seulement étalon D.
Détermination semi - quantitative : employer étalons A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.

Détermination qualitative :

A	BLANK	S5	○	○
B	NEG	S6	○	○
C	POS	S7	○	○
D	CAL D	S8	○	○
E	S1	S9	○	○
F	S2	S10	○	○
G	S3	S11	○	○
H	S4	S12	○	○
			1	2

Détermination semi - quantitative :

A	BLANK	S2	○	○
B	NEG	S3	○	○
C	POS	S4	○	○
D	CAL A	S5	○	○
E	CAL B	S6	○	○
F	CAL C	S7	○	○
G	CAL D	S8	○	○
H	S1	S9	○	○
			1	2

4. Préparez une dilution de **1:51** du spécimen patient en mélangeant **10 μl** du spécimen patient à **0.5 ml** de diluant pour échantillons.
 5. Distribuer **100 μl** des étalons, des échantillons de patients dilués, des contrôles négatif et positif dans les puits.
- Note :** Incluez une position avec **100 μl** du diluant pour échantillons comme blanc de réactif. La valeur nulle du lecteur de plaque microtitration devrait être placée en utilisant cette position. L'absorbance de ce micropuits ne devrait pas être 0.3 plus grand que.
6. Laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
 7. Lavage: aspirer le contenu de tous les puits. Ajouter 200-300 μl de tampon dans tous

les puits et l'aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération trois fois supplémentaires pour un total de quatre lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque en la tapotant sur du papier absorbant, pour enlever tout liquide de lavage résiduel. Ne séchez pas les puits complètement.

8. Distribuer 100 µl de conjugué dans chaque puits.
9. Laisser incubé pendant 30 minutes à température ambiante.
10. Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 7.
11. Distribuer 100 µl de substrat enzymatique dans chaque puits
12. Laisser incubé 30 minutes à température ambiante.
13. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du substrat enzymatique. Lire la densité optique (D.O.) dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.
14. Lire la densité optique (D.O.) de chaque puits à 405nm en utilisant un lecteur simple ou dual de plaque microtitration de longueur d'onde contre l'ensemble blanc de réactif à l'absorbance nulle.

RÉSULTATS

Calcul des résultats

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de deux méthodes :

1. DÉTERMINATION QUALITATIVE

$$\frac{\text{D.O. de Spécimen}}{\text{D.O. de Étalon D}} \times \text{XEU/ml de étalon D} = \text{EU/ml de Spécimen}$$

2. DÉTERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Absorbance de parcelle de terrain de étalon A à D contre leur concentration respective sur un papier graphique linéaire-linéaire. Tracez la concentration dans EU / ml sur l'X-axe contre l'absorbance sur l'Y-axe et dessinez la meilleure courbe convenable. Déterminez les concentrations des échantillons patients provenant de la courbe contre sa valeur correspondante d'absorbance. Voir le Figure 1 à la fin de ce document pour une courbe standard.

Étalons

Les étalons sont inclus pour fournir semi - quantitation et doivent être employés avec chaque essai. Les spécimens patients contenant des niveaux plus élevés d'anticorps peuvent donner à des valeurs d'absorbance plus grandes que cela du étalon A. Pour la détermination des valeurs semi-quantitatives précises que de tels spécimens devraient être encore dilués ainsi ils font partie de la marge de la courbe d'étalonnage une fois essayés de nouveau. Pour la détermination de EU / ml, multipliez les unités obtenues par le facteur de dilution.

Interprétation

L'information suivante sert seulement de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Anti-tTG	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/
Indeterminado/Unbestimmt	
>25 EU/ml	Pos (+)

Limites du test

Ce test doit être réalisé avec des sérums comme échantillons. Les sérums contaminés par

des agents microbiens, prétraités par la chaleur ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés. Les sérums ou échantillons hémolysés ou lipémiques sont à éviter. Les résultats obtenus servent seulement d'aide dans le diagnostic et ne devraient pas être interprétés en tant que diagnostic dans eux-mêmes. Dans les patients déficients de IgA, IgA-tTG peut être négatif.

VALEURS PRÉVUES

Les valeurs prévues dans une population normale sont négatives (< 20 EU/ml pour des adultes et des enfants). Cependant, on l'a déterminé que quelques individus apparent en bonne santé et asymptomatiques peuvent examiner le positif pour des anticorps anti-tTG IgA.

L'incidence des anticorps anti-tTG a été étudiée par de divers investigateurs et les résultats sont récapitulés dans le tableau 1 à la fin de ce document.

L'incidence et les niveaux des anticorps anti-tTG dépend du statut de régime. Les niveaux de ces anticorps diminuent et par la suite deviendront négatifs dans les patients présentant le CD qui sont à un régime gluten-libre. De même, les niveaux de ces anticorps augmenteront ou les anticorps anti-tTG deviennent positifs quand les patients présentant le CD qui étaient à un régime gluten-libre ingère un régime contenant du gluten^{10, 11}.

Car il y a plusieurs anticorps liés au CD, l'algorithme sur le Figure 2 à la fin de ce document peut servir de guide dans l'interprétation de divers résultats d'essai pour le CD.

Quelques chercheurs ont adopté l'approche présentée sur le Figure 3 pour établir un diagnostic de CD.

CARACTÉRISTIQUES D'EXÉCUTION

L'utilité de l'ImmuLisa anti-tTG ELISA a été déterminée en comparant les résultats à :

- a) une autre ELISA anti-tTG IgA méthode et
- b) l'ImmuGlo anti-endomysial IFA méthode.

Gamme Normale : La gamme normale a été établie en examinant 64 échantillons de sérum provenant des donateurs apparent en bonne santé obtenus à partir du Red Cross. La coupure égale la valeur moyenne + 3 STD de ces échantillons.

Spécificité et sensibilité comparatifs

- A. ImmuGlo™ EMA vs. ImmuLisa™ hu tTG IgA Anticuerpo ELISA: Un total de 274 échantillons ont été examinés pour EMA en utilisant le kit ImmuGlo et les résultats ont été comparés à la méthode ImmuLisa anti-hu tTG. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 2.
- B. ImmuLisa™ anti-hu tTG IgA ELISA vs. other ELISA: Un total de 74 échantillons ont été examinés sur un kit anticorps ImmuLisa anti-hu tTG IgA et un autre anti-hu tTG IgA kit. Les résultats de ces derniers apparaissent dans le tableau 3.
- C. Réactivité En travers : Un total de 65 contrôles de la maladie ont été examinés. Aucun n'a été trouvé positif.

Précision :

On a analysé les échantillons avec des concentrations connues d'anti-tTG IgA dans 10 répliques pendant deux semaines. L'intra- et inter-analyse CV ont été calculés. Voir Le Tableau 4.

Rétablissement

Des échantillons avec des concentrations connues d'IgA anti-tTG ont été mélangés aux dilutions appropriées d'un autre échantillon positif avec des quantités connues d'anti-tTG IgA. Anti-tTG IgA que des niveaux d'anticorps des échantillons mélangés ont été déterminés et à partir des valeurs a obtenu le rétablissement de pour cent calculé. Les résultats apparaissent dans le tableau 5.



ImmULisa™ Anti- Transglutaminasa Tisular (tTG) Anticuerpos IgA ELISA

IVD

REF 1144 IgA-tTG 96 Determinations

ImmULisa™ anti-tTG ELISA es un ensayo basado en la técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para la detección semi cuantitativa de anticuerpos IgA anti-tTG. La detección de estos anticuerpos resulta útil para la diagnosis de ciertas enteropatías sensibles al gluten, como la enfermedad celíaca y la dermatitis herpetiforme.

SUMARIO Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

CD es un desorden gastrointestinal autoinmune que puede ocurrir en los individuos genético susceptibles accionados por la ingestión de granos con gluten tales como trigo, cebada y centeno. De los muchos desórdenes autoinmunes, el CD representa uno del pocos donde se sabe el agente etiológico y la enfermedad se desploma y entra en la remisión que el agente etiológico se retira una vez de la dieta.

El CD es caracterizado por el malabsorbition resultando de lesión inflamatoria a la mucosa intestinal pequeña y, cuando está prolongado, puede causar la desnutrición. Los síntomas clásicos del CD incluyen diarrea, pérdida del peso y la desnutrición.

Solamente un porcentaje pequeño de pacientes con el CD presenta con síntomas clásicos. Por lo tanto, el espectro clínico del CD ha crecido mucho más amplio que en el pasado para incluir a los pacientes que no presentan con síntomas clásicos. No es infrecuente para los síntomas iniciales sean no-gastrointestinal o que los síntomas gastrointestinales, si presente, ser suave o intermitente.

Los estudios han encontrado el predominio del CD para ser altamente variables de la población a la población.¹ El predominio verdadero ha sido difícil de comprobar. Los criterios dispares usados en la diagnosis del CD son a menudo la causa. Si los criterios clínicos solamente se utilizan en la determinación de predominio, la incidencia del CD es mucho más baja con respecto a la incidencia establecida por métodos serológicos.^{1,2} Los métodos serológicos que usan, la incidencia del CD en la población en general son aproximadamente uno en 200.

La diagnosis del CD basada en criterios clínicos así puede ser engañosa y puede conducir a serio retrasa en diagnosis apropiada. Con frecuencia, retrasa en diagnosis amplían 10-13 años de la primera presentación clínica de síntomas.

La falta de diagnosticar el CD encendido puede predisponer temprano a un individuo a las complicaciones a largo plazo tales como atrofia esplénico y linfoma intestinal. La incidencia del linfoma que se presenta en el contexto del CD es difícil de comprobar. Un estudio ha demostrado la incidencia del linfoma que implicaba la zona gastrointestinal en pacientes con el CD para extenderse a partir de 3.6% a 40%.³ En otro estudio reciente, el CD se asocia al riesgo perceptiblemente elevado para el linfoma intestinal, especialmente para los non-Hodgkin's⁴. Una dieta gluten-libre (GFD) normaliza la mucosa y las ayudas reduce el potencial malo.

La examinación histológica de la biopsia intestinal pequeña sigue siendo el patrón oro para diagnosticar el CD, pero tiene sus propias limitaciones. Éstos incluyen a algunos pacientes con el CD latente o aún activo que puede tener histopatología normal.⁵

El ESPGHAN criterios revisado incluye solamente una sola biopsia con la remisión neta de síntomas clínicos en GFD⁶. La serología positiva a la hora de la diagnosis con la desaparición

en GFD contribuye a la diagnosis. Las varias pruebas serológicas empleadas incluyen el anticuerpo anti-gliadina (AGA), el anticuerpo anti-endomisio (EMA), el anticuerpo anti-reticulina (ARA) y las pruebas del anticuerpo anti-tTG. Los anticuerpos al gliadina y al tTG son detectados por ELISA, mientras que los anticuerpos del endomisio y del reticulina son detectados por inmunofluorescencia indirecta. EMA son indicadores muy específicos del CD. Sin embargo, la prueba EMA es un método que requiere experiencia en reacciones de la inmunofluorescencia de la lectura. Rosario et al ⁷ concluye que "EmA-IgA es 100% sensible y específico en IgA-suficientes pacientes activos del CD cuando es realizado por un laboratorio establecido."

Desde la identificación del tTG como el antígeno endomisio, los métodos ELISA se han descrito para detectar los anticuerpos en los sueros de pacientes con el CD. La ventaja del análisis del anticuerpo anti-tTG es que es automatizable y menos subjetiva que EMA. Por esta razón, muchos laboratorios tienen optaron utilizar el método del anticuerpo tTG como el método de investigación. En estos laboratorios, puede ser el único análisis usado para la detección de los casos del CD. En varios estudios en la eficacia del método del anticuerpo tTG para defender para el CD, la especificidad y la sensibilidad de este método se ha encontrado para extenderse a partir de 90% a 95%. El tTG humanos ha descrito para mejorar la sensibilidad del análisis del anticuerpo tTG para el CD.

PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

contienen antígeno tTG recombinante. La microplaca se bloquea para reducir reacciones no específicas. Se añaden controles, calibradores y muestras diluidas en pocillos separados, uniéndose durante la incubación los anticuerpos anti tTG al antígeno que los recubre. El resto de componentes no unidos se elimina mediante lavado y se añade conjugado anti IgA humana a cada pocillo. Este la enzima conjugó los anticuerpos ata específicamente a la inmunoglobulina humana de la clase IgA. Tras un lavado que elimina el conjugado sobrante, se agrega el sustrato enzimático específico (pNPP). Tras incubación la actividad enzimática presente en el pocillo es proporcional a la intensidad de color desarrollado. Se determina la presencia o ausencia de anticuerpos contra la tTG por medio de la comparación de la densidad óptica de la muestra con la de una curva de calibración de cuatro puntos. Los resultados se dan a conocer de forma semicuantitativa en unidades ELISA (EU/ml).

REACTIVOS

Condiciones de Almacenaje

Guardar todos los reactivos del kit en nevera a 2-8°C. No congelar. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si son almacenados y manipulados correctamente.

No utilizar si el reactivo no está claro.

Tampón de lavado: Agregar el agua destilada o desionizada para el volumen del 1L.

Micropocillos: Utilizar una vez solamente.

Precauciones

Todo material de origen humano usado en la preparación de los controles para este producto se ha examinado resultando negativo para anticuerpos contra HIV, HbsAg, y HCV por métodos aprobados por la FDA. Ningún método puede sin embargo ofrecer garantía completa que HIV, HBV, HCV o otros agentes contagiosos estén ausentes. Por lo tanto, los reactivos deben manejarse como si fueran material⁹ potencialmente contagioso.

Dado que se utiliza azida sódica como conservante, este producto puede ser tóxico por ingestión o absorción a través de piel o mucosas. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si se utilizan desagües para la eliminación de reactivos se recomienda lavarlos con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas metálicas.

La sustitución de componentes diferentes de los incluidos en el sistema puede generar resultados inconsistentes.

Utilizar las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química.

No utilizar después de fecha de vencimiento.

Materiales Suministrados

ImmuLisa™ IgA-tTG ELISA REF 1144

El kit contiene los suficientes reactivo para realizar 96 determinaciones.

12 x 8	MICROPLATE tTG	Microplaca con los micropocillos disidentes individuales cubrió con el antígeno del tTG.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A IgA-tTG * †	Calibrador A (<i>casquillo verde</i>), listo para uso. Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B IgA-tTG * †	Calibrador B (<i>casquillo violeta</i>), listo para uso. Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C IgA-tTG * †	Calibrador C (<i>casquillo azul</i>), listo para uso. Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D IgA-tTG * †	Calibrador D (<i>casquillo amarillo</i>), listo para uso. Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	CONTROL + IgA-tTG * †	control positivo, listo para uso. (<i>casquillo rojo</i>). Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	control negativo, listo para uso. (<i>casquillo blanco</i>). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	conjugado fos. alc. Color de rosa cifrado color.
1 x 60 ml	DIL *	tampón de dilución para muestras. Azul cifrado color.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	substrato enzimático. Contiene el pNPP. Proteger contra luz.
1 x 12 ml	STOP	solución de parada
2	BUF WASH	tampón de lavado para 1 litro/vial

* PRECAUCIÓN - Contiene < 0.1% NaN₃

Material necesario no incluido

- Micropipetas para 5 - 1000µl
- Puntas desechables para micropipeta
- Tubos para dilución de muestras, 4ml
- Agua destilada
- Lector de microplacas capaz de medir densidades ópticas a 405nm
- Botella para tampón de lavado
- Contador de tiempo
- Papel absorbente

Recolección de Muestras

Este kit requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras contaminadas, tratadas por calor o que contengan partículas visibles. Deben asimismo evitarse las muestras lipémicas o hemolizadas.

Guardar las muestras a temperatura ambiente no más de 8 horas. Si el ensayo no se va

completar en 8 horas, refrigerar la muestra a 2-8°C. Si el ensayo no se va completar entre 48 horas, o para enviar las muestras, congelar a -20°C o a temperatura inferior. Evitar congelar repetido y deshelar.

PROCEDIMIENTO

Notas Procesales

- Antes comenzando con el análisis leer cuidadosamente el relleno del producto.
- Dejar los especímenes del suero y los reactivo de la prueba equilibrar en la temperatura ambiente antes comenzando con el método de prueba. Volver todos los especímenes y reactivo inusitados al refrigerador inmediatamente después del uso.
- Todas las dilusiones de las muestras pacientes se deben preparar antes comenzando con del análisis.
- Quitar requirió tiras del micropocillos de la bolsa y resellan cuidadosamente la bolsa para prevenir la condensación en los pozos inusitados. Volver la bolsa inmediatamente al refrigerador.
- *Lavado: La buena técnica es crítica. Se recomienda una arandela automatizada del microplaca.*
- Utilizar una pipeta de varios canales capaz de entregar 8 pozos simultáneamente. Esto apresura el proceso y preve por un más tiempo uniforme de la incubación.
- Para todos los pasos, el control cuidadoso de la sincronización es importante. El comienzo de todos los períodos de la incubación comienza con la terminación de la adición el reactivo.

Metodología

1. Llevar todos reactivos y muestras a la temperatura ambiente.
2. Indicar la colocación del espécimen en la página del protocolo. Es buena práctica del laboratorio funcionar muestras en duplicado.
3. **Determinación cualitativo:** Utilizar solamente el calibrador D. **Determinación semi cuantative:** Utilizar calibradores A a D según lo representado en la disposición de la muestra abajo.

Determinación cualitativo

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

Determinación semi cuantative

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

4. Preparar una dilución 1:51 de cada muestra a procesar añadiendo 10 µl de muestra a 0.5 ml de tampón de dilución para muestras.
5. Agregar 100 µl de los controles, de calibradores, de y las muestras pacientes diluidas a los micropocillos apropiados según protocolo cubre.
Nota: Incluir un pozo que contenga **100 µl** del tampón de dilución para muestras como espacio en blanco el reactivo. Poner a cero a lector de ELISA contra el espacio en blanco el reactivo.
6. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente.
7. Lavado (4x): Aspirar el contenido de cada pocillo. Agregar 200-300µl de solución

de lavado a todos pocillos y aspirar. Para el lavado manual, llenar cada micropocillos del almacenador intermediario reconstituido de la colada. Desechar el líquido invirtiendo y golpeando ligeramente fuera del contenido de cada uno el pozo o aspirando el líquido de cada uno bien. Para borrar en el extremo de la colada pasada, de las tiras invertidas y golpear ligeramente los pozos vigoroso en las toallas de papel absorbentes. Para las arandelas automáticas, programar la arandela según las instrucciones del fabricante.

8. Agregar 100 µl de conjugado en micropocillos.
9. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente.
10. Lavado: Todos los micropocillos como en 7.
11. Agregar 100 µl de sustrato enzimático en cada micropocillos en la misma orden y la sincronización que para el conjugado.
12. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente.
13. Agregar 100 µl de solución de parada en cada micropocillos usando la misma orden y midiendo el tiempo que para la adición del sustrato enzimático. Leer los valores de la absorbencia en el plazo de 1 hora de agregar solución de parada.
14. Leer la absorbancia (OD) de cada pocillo a 405nm en un plazo máximo de una hora. Si se desea seguir el método de lectura bicromática puede utilizarse 620 nm como longitud de onda de referencia.

Control de calidad

Los calibradores, control positivo y control negativo y un espacio en blanco el reactivo se deben funcionar con cada análisis para verificar la integridad y la exactitud de la prueba. La lectura de la absorbencia del espacio en blanco el reactivo debe ser < 0.3. El calibrador A debe tener una lectura de la absorbencia de no menos que 1.0, si no la prueba debe ser repetida. El control negativo debe ser < 20 EU/ml. Si la prueba se funciona en duplicado, el medio de las dos lecturas se debe tomar para EU/ml de determinación. Mientras que realiza las determinaciones cualitativas, la densidad óptica del calibrador D debe ser mayor que la del control negativo y de menos que la absorbencia del control positivo. Para las determinaciones semi cuantitativas el control positivo debe dar valores en la gama indicada en el frasco.

RESULTADOS

Cálculo de Resultados

Las concentraciones de las muestras pacientes se pueden determinar por cualquiera de dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

$$\frac{\text{OD Espécimen}}{\text{OD Calibradore D}} \times \text{EU/ml de Calibradore D} = \text{EU/ml Espécimen}$$

2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTATIVE

Absorbancia del diagrama de Calibradore A a D contra su concentración respectiva en un papel de gráfico linear-linear. Trazar la concentración en EU / ml en el X-eje contra la absorbancia en el Y-eje y dibujar la mejor curva apta. Determinar las concentraciones de las muestras pacientes de la curva contra su valor correspondiente de la absorbancia. Ver Figure 1 en el extremo de este documento para una curva estándar.

Calibrador

Los calibradores se incluyen para proporcionar semi - cuantificación y se deben utilizar con cada prueba. Los especímenes pacientes que contienen niveles más altos del anticuerpo pueden dar los valores de la absorbancia mayores que el del Calibradore A. Para que determina valores semi-cuantative exactos tales especímenes debe ser diluido más a fondo así que bajan dentro de la gama de la curva del calibrador cuando están reexaminados. Para determinación EU / ml, multiplicar las unidades obtenidas por el factor de la dilusión.

Interpretación

La información siguiente sirve solamente como guía en la interpretación de los resultados del laboratorio. Cada laboratorio debe determinar sus propios valores normales.

Limitaciones del Procedimiento

Este kit requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras contaminadas, tratadas por calor o que contengan partículas visibles. Deben asimismo evitarse las muestras lipémicas o hemolizadas. No se puede realizar un diagnóstico tomando como base sólo los resultados de tTG. En pacientes deficientes de IgA, IgA-anti-tTG puede ser negativo.

VALORES

Los valores previstos en una población normal son negativos (< 20 EU/ml para los adultos y los niños). Sin embargo, se ha determinado que algunos individuos al parecer sanos, asintomáticos pueden probar el positivo para los anticuerpos anti-tTG IgA.

La incidencia de los anticuerpos anti-tTG ha sido estudiada por los varios investigadores y los resultados se resumen en Table 1 en el extremo de este documento.

La incidencia y los niveles de los anticuerpos anti-tTG es dependientes sobre el estado de la dieta. Los niveles de estos anticuerpos disminuyen y llegarán a ser eventual negativos en los pacientes con el CD que están en una dieta gluten-libre. Semejantemente, los niveles de estos anticuerpos aumentarán o los anticuerpos anti-tTG llegan a ser positivos cuando los pacientes con el CD que estaban en una dieta gluten-libre injieren una dieta con gluten ^{10,11}. Pues hay varios anticuerpos asociados al CD, el algoritmo en Figure 2 en el extremo de este documento puede servir como guía en la interpretación de los varios resultados de la prueba para el CD.

Algunos investigadores han tomado el acercamiento presentado en Figure 3 para establecer una diagnosis del CD.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La utilidad del ImmuLisa anti-tTG IgA ELISA fue determinada comparando los resultados con:

- a) otro método anti-tTG IgA ELISA y
- b) ImmuGlo anti-endomysial IFA Método

Valores Normales: La gama normal fue establecida probando 64 muestras del suero de los donantes al parecer sanos obtenidos del Red Cross. El atajo iguala el valor medio + 3 STD de estas muestras.

Especificidad y sensibilidad comparativos

- A. ImmuGlo™ EMA vs. ImmuLisa™ hu tTG IgA Anticuerpo ELISA: Un total de 274 muestras fue probado para EMA usando el kit ImmuGlo y los resultados fueron comparados con el método ImmuLisa anti-hu tTG. Los resultados se resumen en la tabla 2.
- B. ImmuLisa™ anti-hu tTG IgA ELISA vs. other ELISA: Un total de 74 muestras fue probado en el kit del anticuerpo de ImmuLisa y otro kit comercial. Los resultados de éstos aparecen en la tabla 3.
- C. Reactividad Cruzada: Un total de 65 controles de la enfermedad fue probado. No se encontró ningunos positivos.

Precisión:

Dos muestras con concentraciones sabidas de ACA fueron probadas en 10 réplicas durante dos semanas. Intra - y inter-análisis CV era calculado. Ver La Tabla 4.

Recuperación

Los especímenes con concentraciones sabidas de ACA fueron mezclados con otro espécimen del positivo de ACA. Los valores de IgG, de IgA y de IgM ACA de los especímenes mezclados fueron determinados y la recuperación era calculada. Los resultados aparecen en Table 5.



ImmuLisa™
Anti-Gewebe-Transglutaminase (tTG)
Antikörper IgA ELISA

IVD

REF 1144 **IgA-tTG** 96 Determinations

ImmuLisa™ anti-tTG ELISA ist ein „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) für die semi-quantitative Bestimmung von IgA Antikörpern gegen tTG im Humanserum. Die Bestimmung dieser Antikörper dient der Diagnose von bestimmten gluteninduzierten Enteropathien wie Zöliakie und Dermatitis herpetiformis.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

CD ist eine autoimmune gastro-intestinale Störung, die in den genetisch empfindlichen Einzelpersonen auftreten kann, die durch die Einnahme der glutenhaltigen Körner wie Weizen, Gerste und Roggen ausgelöst werden. Von den vielen autoimmunen Störungen stellt CD eins von den wenigen dar, wo das ätiologische Mittel bekannt und die Krankheit in Erlaß nachläßt und geht, einmal, welches das ätiologische Mittel von der Diät zurückgenommen wird.

CD wird durch malabsorption gekennzeichnet, resultierend aus entzündlicher Verletzung des kleinen intestinalen Mucosa und, wenn sie ausgedehnt wird, kann Unterernährung verursachen. Die klassischen Symptome der CD schließen Diarrhöe, Gewichtsverlust und Unterernährung ein.

Nur ein kleiner Prozentsatz der Patienten mit CD stellt sich mit klassischen Symptomen dar. Infolgedessen ist das klinische Spektrum der CD viel ausgedehnter als in der Vergangenheit gewachsen, zum der Patienten mit einzuschließen, die sich nicht mit klassischen Symptomen darstellen. Es ist nicht selten für die Ausgangssymptome, nicht-gastro-intestinal zu sein oder für gastro-intestinale Symptome, wenn Geschen, mild oder zeitweilig zu sein.

Studien haben das Vorherrschen der CD gefunden, um von Bevölkerung zu Bevölkerung in hohem Grade variabel zu sein.¹ das zutreffende Vorherrschen ist schwierig zu ermitteln gewesen. Die unvereinbaren Kriterien, die in der Diagnose der CD verwendet werden, sind häufig die Ursache. Wenn klinische Kriterien alleine verwendet werden, wenn man Vorherrschen feststellt, ist die Ausdehnung der CD verglichen mit der Ausdehnung viel niedriger, die durch serologische Methoden hergestellt wird.^{1,2} Verwendende serologische Methoden, die Ausdehnung der CD in der allgemeinen Bevölkerung ist ungefähr eine in 200.

Die Diagnose der CD basiert auf klinischen Kriterien kann irreführend folglich sein und kann zu ernstes führen verzögert in der korrekten Diagnose. Häufig verzögert in der Diagnose verlängern 10-13 Jahre von der ersten klinischen Darstellung von Symptomen.

Störung, CD zu bestimmen früh kann eine Einzelperson zu den langfristigen Komplikationen wie splenic Atrophie und intestinale Lymphom an vorbereiten. Die Ausdehnung des Lymphoms entstehend im Kontext der CD ist schwierig zu ermitteln. Eine Studie hat die Ausdehnung des Lymphoms die gastro-intestinale Fläche bei Patienten in CD mit einbeziehend, um von 3.6% bis zu 40% zu reichen gezeigt.³ In einer anderen neuen Studie, ist CD mit erheblich erhöhter Gefahr für intestinales Lymphom, besonders für non-Hodgkins verbunden⁴. Eine Gluten-freie Diät (GFD) normalisiert den Mucosa und die Hilfen verringern das bösartige Potential.

Histologische Prüfung der kleinen intestinalen Biopsie bleibt die Goldaktie für die Diagnose der CD, aber sie hat seine eigenen Beschränkungen. Diese schließen einige Patienten mit latenter oder sogar aktiver CD mit ein, die normalen Histopathology haben kann.⁵

Die korrigierten Kriterien von ESPGHAN nur eine einzelne Biopsie mit scharf geschnittenem Erlaß der klinischen Symptome auf GFD ⁶. Positive Serologie zu der Zeit der Diagnose mit Verschwinden auf GFD trägt zur Diagnose bei. Die verschiedenen serologischen Tests die vermutet werden, um CD Anti-Gliadin Antikörper (AGA), Anti-endomysial Antikörper (EMA), Anti-reticulin Antikörper (ARA) und Anti-tTG mit einschließen zu lassen Antikörpertests. Antikörper zum Gliadin und zum tTG werden von ELISA ermittelt, während Endomysium und Reticulinantikörper durch indirekte Immunfluoreszenz ermittelt werden. EMA sind sehr spezifische Anzeigen der CD. Jedoch ist der EMA Test eine Immun-histochemische Methode, die Erfahrung in den Leseimmunofluoreszenzreaktionen erfordert. Rosario et al ⁷ stellt fest, daß "EmA-IgA 100% und Besondere bei den aktiven, unbehandelten IgA-genügenden CD-Patienten empfindlich ist, wenn es durchgeführt wird durch ein hergestelltes Labor."

Seit Kennzeichnung von tTG als dem Endomysialantigen, sind ELISA Methoden für das Ermitteln der Antikörper in den Seren der Patienten mit CD beschrieben worden. Der Vorteil der anti-tTG Antikörperprobe ist, daß er automatable und weniger subjektiv als EMA ist. Aus diesem Grund haben viele Labors entscheiden, die tTG Antikörpermethode als die Siebmethode zu verwenden. In diesen Labors kann es die einzige Probe sein, die für Abfragung der CD-Fälle verwendet wird. In den verschiedenen Untersuchungen über die Wirksamkeit der tTG Antikörpermethode für das Aussortieren für CD, ist die Besonderheit und die Empfindlichkeit dieser Methode gefunden worden, um von 90% - 95% zu reichen.

TESTPRINZIP

Rekombinant tTG Antigen wurde an die Einzelvertiefungen der Polystyrol-Mikrotiterplatte. Der ohne Reaktion Aufstellungsorte werden blockiert, um unspezifische Reaktionen zu verringern. Kontrollen, Kalibratoren und verdünnte Patientenserum werden in verschiedene Einzelvertiefungen pipettiert. Die vorhandenen tTG Antikörper binden an das Antigen. Der Rest der Probe/Kontrolle wird durch Waschen entfernt. Enzymmarkiertes anti-humane IgA wird in die Einzelvertiefungen pipettiert. Dieses konjugierte Enzym Antikörper binden spezifisch an das menschliche Immunglobulin der IgA Kategorie. Nachdem in einem weiteren Waschschritt das restliche Konjugat entfernt worden ist, wird ein spezifisch Substrat (pNPP) zugegeben. Die Intensität der entstandenen Farbreaktion wird nach dem Abstoppen mit dem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Nach Anhalten der enzymatischen Reaktion von farbigen Produkten die Intensität der Farbe Änderung zur Konzentration des Antikörpers ist proportional. Die Ergebnisse werden semi-quantitativ in ELISA Maßeinheiten (EU/ml) protokolliert.

INHALT DER TESTPACKUNG

Lagerung

Lagerung aller Kit-Reagenzien bei 2-8°C. Nicht einfrieren. Die Reagenzien sind stabil bis zum Ende des Haltbarkeitsdatums bei vorschriftsmäßiger Lagerung und Handhabung.

Nicht verwenden, wenn Reagen nicht frei ist.

Wäschepuffer: Destilliertes oder entionisiertes Wasser für 1L Volumen hinzufügen.

Einzelvertiefungen: Nur einmal verwenden.

Vorsichtsmaßnahmen

Alle Reagenzien für die Herstellung dieses Tests wurden auf Antikörper gegen HIV, HBsAg und HCV getestet und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kontrollen wie potentiell infektiöses Humanserum oder Blutproben behandelt werden⁹.

NaN₃ wird als Stabilisator verwendet. NaN₃ ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen verursachen. Vorsichtig handhaben und Kontakt mit Augen und Haut vermeiden! Den Kontakt mit Metall, basischen Stoffen oder anderen Komponenten, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Bei der Entsorgung von Reagenzien ist daher mit viel Leitungswasser nachzuspülen, um Ansammlungen im Abwassersystem zu verhindern.

Die Verwendung anderer als im Testkit vorhandenen Komponenten kann zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.

Gute Labortechniken verwenden, um Mikroben- und chemische Verschmutzung herabzusetzen.

Nicht nach Verfallsdatum verwenden.

In der Testpackung vorhandenes Material

ImmuLisa™ IgA-tTG ELISA REF 1144

Installationssätze enthalten genügende Reagenzien, um 96 Ermittlungen jede durchzuführen.

12 x 8	MICROPLATE tTG	Mikroplatte mit 96 Einzelvertiefungen beschichtet mit Cardiolipin Antigen.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A IgA-tTG * †	Kalibrator A (<i>grüne Kappe</i>), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B IgA-tTG * †	Kalibrator B (<i>violette Kappe</i>), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C IgA-tTG * †	Kalibrator C (<i>blaue Kappe</i>), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D IgA-tTGv * †	Kalibrator D (<i>gelbe Kappe</i>), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	CONTROL + IgA-tTG * †	Positive Kontrolle (<i>rote Kappe</i>), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Negative Kontrolle (<i>weiße Kappe</i>), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	Alkalische Phosphatase Konjugat. Farbe kodierter Pink.
1 x 60 ml	DIL *	Gepuffertes Probediluent. Farbe kodiertes Blau.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Enzym Substrat. Enthält pNPP. Vor Licht schützen.
1 x 12 ml	STOP	Stopplösung
2	BUF WASH	Waschpuffer für je 1 Liter

* enthält < 0.1% NaN₃

Zusätzliches benötigtes Material

- Pipetten für 5 - 1000 µL
- Einmal-Pipettenspitzen
- Eppendorf-Reaktionsgefäße für die Serumverdünnung, 4 mL Volumen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Reader für Mikrotiterplatten mit 405 nm Filter
- Flasche für Wäschepuffer
- Timer
- Saugfähiges Papier

Proben

Die Testdurchführung sollte mit Serumproben erfolgen. Mikrobakteriell kontaminierte, hämolytische, lipämische oder durch Hitzeeinwirkung inaktivierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Proben bei Raumtemperatur nicht länger als 8 Stunden lagern. Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 8 Stunden erfolgen, die Proben bei 2-8°C kühl lagern. Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 48 Stunden erfolgen ist die Probe bei -20°C oder niedriger einzufrieren. Das wiederholte Einfrieren und das Auftauen vermeiden.

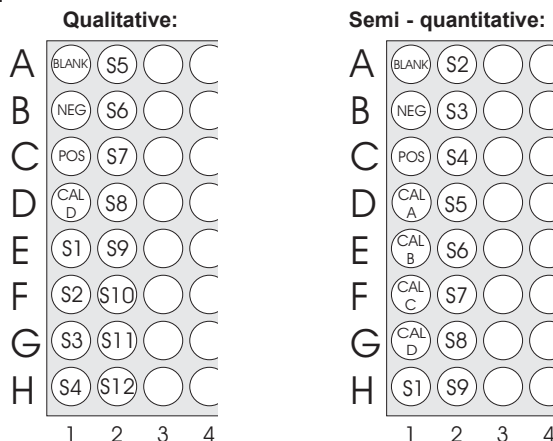
Methode

Testvorbereitung

- Bevor sie begann, las die Probe diese Anweisungen sorgfältig.
- Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen (20-26°C) für 30 Minuten. Rückholmaterialien zum Kühlraum sofort nach Gebrauch.
- Alle Verdünnungen der geduldigen Probestücke vorbereiten, bevor Sie den Test beginnen.
- Waschen: Gute Technik ist kritisch. Eine automatisierte Mikrotiter-ELISA-Platte Unterlegscheibe wird empfohlen.
- Eine Mehrkanalpipette benutzen, die zu 8 Positionen gleichzeitig liefern fähig ist. Dieses beschleunigt den Prozeß und stellt während einer konstanteren Ausbrütungszeit zur Verfügung.
- Zeit sorgfältig überwachen. Ausbrütung- Perioden fangen an, nachdem sie Reagenzien zugeführt haben.

Testdurchführung

1. **ALLE REAGENZIEN UND PATIENTENPROBEN AUF RAUMTEMPERATUR (20-26°C) BRINGEN.**
2. Protokollaufzeichnung benutzen, um Position der Probestücke zu merken. Es ist gutes Laborüblich, Probestücke in doppelter Ausführung zu prüfen.
3. **Qualitative:** nur Kalibrator D verwenden.
Semi - quantitative: Kalibratoren A - D verwenden, wie im Beispiel unten gezeigt.



4. Eine **1:51** Verdünnung des geduldigen Probestücks vorbereiten, indem Sie **10 µL** des geduldigen Probestücks mit **0.5 ml** von Gepuffertes Probendiluent.
5. **100µL** von jedem der Kalibratoren, der verdünnten Patientenproben, der Negative Kontrolle und der Positive Kontrolle in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
Anmerkung: Eine Position mit **100 µL** Gepuffertes Probendiluent als Reagensfreier Raum einschließen. Der nullwert des Mikrotiter-Platte Lesers sollte mit dieser Position eingestellt werden. Die Absorption dieses Einzelvertiefung sollte nicht als 0.3 grösser sein.
6. Bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Waschen: Den Inhalt aller Einzelvertiefungen absaugen. Die Einzelvertiefungen vollständig (**200-300 µL**) mit Waschpuffer füllen und dann gründlich absaugen. Diesen Waschschrift noch dreimal wiederholen (Insgesamt: vier Waschschrift). Anschließend die Platte auf saugfähigem Papier ausklopfen, um restliche Waschflüssigkeit zu entfernen. Nicht vollständig trocknen.
8. **100 µL** des Konjugates in jede Einzelvertiefung geben.

9. Bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
10. Waschen: Schritt Nr. 7 wiederholen.
11. 100 µL Enzym Substrat in jede Einzelvertiefung geben.
12. 30 Minuten bei Raum-temperatur inkubieren.
13. 100 µL Stopplösung in jede Einzelvertiefung pipettieren. Bei der Hinzugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Zeitplan wie bei der Hinzugabe des Enzym Substrat einhalten. Die optische Dichte (OD) innerhalb einer Stunde nach Abstoppen der Reaktion ablesen.
14. Die optische Dichte (OD) jeder Einzelvertiefung bei 405 nm ablesen mit einem einzelnen oder Doppelwellenlänge Mikrotiter-Platte Leser mit dem Reagensfreier Kavität bei null lesen.

ERGEBNISSE

Berechnung der Ergebnisse

Die Konzentrationen der geduldigen Proben können durch irgendeine von zwei Methoden festgestellt werden:

1. QUALITATIVE ERMITTLUNG

$$\frac{\text{OD von Probestück}}{\text{OD von Kalibrator D}} \cdot X \text{ EU/ml von Kalibrator D} = \text{EU/ml von Probestück}$$

2. SEMIQUANTITATIVE ERMITTLUNG

Die optische Dichte von Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf linear-linearen Zeichenpapier mit Maßeinteilung notieren. Die Konzentration EU / ml auf der X-Mittellinie gegen die Absorption auf der Y-Mittellinie plotten und die beste passende Kurve zeichnen. Die Konzentrationen der geduldigen Proben von der Kurve gegen seinen entsprechenden Absorption Wert feststellen. Siehe Figure 1 am Ende dieses Dokumentes für eine Standardkurve.

Kalibratoren

Die Kalibratoren sind eingeschlossen, um halb zur Verfügung zu stellen - quantitative Bestimmung und müssen mit jedem Test verwendet werden. Die geduldigen Probestücke, die höhere Antikörpermiveaus enthalten, können die Absorption Werte geben, die grösser sind, als das des Kalibrator A. Das genaue semiquantitative Werte solche Probestücke feststellt, weiter verdünnt werden sollte, also sie innerhalb des Bereiches der Kalibratorkurve fallen, wenn sie erneut getestet werden. Für feststellen EU / ml, die Maßeinheiten multiplizieren, die mit dem Verdünnungsfaktor erhalten werden.

Deutung

Die folgenden Informationen dienen nur als Führer in der Deutung der Laborresultate. Jedes Labor muß seine eigenen normalen Werte feststellen.

Anti-tTG	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

Grenzen des Verfahrens

Die Testdurchführung sollte mit Serumproben erfolgen. Mikrobakteriell kontaminierte, hämolytische, lipämische oder durch Hitzeeinwirkung inaktivierte Proben sollten nicht verwendet werden. Die Methode sollte für die Prüfung nur der menschlichen Serumproben verwendet werden. Die erreichten worden Resultate dienen nur als Hilfsmittel in der Diag-

nose und sollten nicht als Diagnose in selbst gedeutet werden. Bei IgA unzulänglichen CD-Patienten kann anti-tTG negativ sein.

ERWARTETE WERTE

Die erwarteten Werte in einer normalen Bevölkerung sind negativ (< 20 EU/ml für Erwachsene und Kinder). Jedoch ist es festgestellt worden, daß einige anscheinend gesunde, asymptomatische Einzelpersonen Positiv auf IgA anti-tTG Antikörper prüfen können.

Die Ausdehnung der anti-tTG Antikörper ist von den verschiedenen Forschern studiert worden und die Entdeckungen werden in Table 1 am Ende dieses Dokumentes.

Die Ausdehnung und die Niveaus der anti-tTG Antikörper ist nach dem Diätstatus abhängig. Die Niveaus dieser Antikörper verringern sich und schließlich werden bei Patienten mit CD negativ werden, die auf einer Gluten-freien Diät sind. Ähnlich erhöhen sich die Niveaus dieser Antikörper, oder die anti-tTG Antikörper werden positiv, wenn Patienten mit CD, die auf einer Gluten-freien Diät waren, eine glutenhaltige Diät einnimmt^{10, 11}.

Da es einige Antikörper gibt, die mit CD verbunden sind, kann der Algorithmus in Figure 2 am Ende dieses Dokumentes als Führer in der Deutung der verschiedenen Testergebnisse für CD dienen. Einige Forscher haben die Annäherung genommen, die in Figure 3 dargestellt wird, um eine Diagnose der CD herzustellen.

LEISTUNGSMERKMALE

Das Dienstprogramm des ImmuLisa™ anti-tTG IgA Antibody ELISA wurde festgestellt, indem man die Resultate mit verglich:

- A) eine andere im Handel erhältliche anti-tTG IgA ELISA Methode und
- B) ImmuGlo™ anti-endomysial Antikörper-Immunofluoreszenzmethode.

Normale Strecke: Die normale Strecke wurde hergestellt, indem man 64 Serumproben von den anscheinend gesunden Spendern prüfte, die vom Red Cross erhalten werden. Die Abkürzung entspricht dem Durchschnittswert + 3 STD dieser Proben.

Vergleichbar Spezifität und Sensitivität

- A. ImmuGlo™ EMA vs. ImmuLisa™ hu tTG IgA Antikörper ELISA: Eine Gesamtmenge von 274 Proben wurden auf EMA mit dem ImmuGlo Installationssatz geprüft und die Se Resultate wurden mit der ImmuLisa anti-hu tTG Methode verglichen. Die Resultate werden in Tabelle 2 zusammengefaßt.
- B. ImmuLisa™ anti-hu tTG IgA ELISA vs. other ELISA: Eine Gesamtmenge von 74 Proben wurden auf dem ImmuLisa Antikörperinstallationssatz und einem anderen kommerziellen Installationssatz geprüft. Die Resultate dieser erscheinen in Tabelle 3.
- C. **Kreuzreaktivität:** Eine Gesamtmenge von 65 Krankheitkontrollen wurden geprüft. Keine wurden positiv gefunden.

Präzision:

Proben mit bekannten Konzentrationen von anti-tTG IgA wurden in 10 Verdoppelungen über eine Zeitdauer von zwei Wochen geprüft. Intra - und Zwischen-Probe CV wurden errechnet. Tabelle 4 Sehen.

Wiederaufnahme:

Proben mit bekannten anti-tTG IgA Konzentrationen wurden mit passenden Verdünnungen einer anderen positiven Probe mit bekannten Mengen anti-tTG IgA. Anti-tTG IgA gemischt, Antikörper, denniveaus der Mischproben festgestellt wurden und von den Werten erreichte die errechnete Prozentwiederaufnahme. Die Resultate erscheinen in Table 5.



ImmuLisa™ Anti-Transglutaminase Tissutale (tTG) Anticorpi IgA ELISA

IVD

REF 1144 IgA-tTG 96 Determinations

ImmuLisa™ tTG IgA ELISA è un test immunoenzimatico per la ricerca semi-quantitativa di anticorpi anti-tTG nel siero umano. La rilevazione di questi anticorpi rappresenta un aiuto nella diagnosi di certe enteropatie sensibili al glutine quali la malattia celiaca e la dermatite erpetiforme.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

CD è un disordine gastrointestinale autoimmune che può accadere in individui geneticamente suscettibili innescati dall'ingestione dei grani contenenti glutine quali frumento, orzo e segale. Dei molti disordini autoimmuni, il CD rappresenta uno dei pochi dove l'agente eziologico è conosciuto e la malattia si abbassa e va nella remissione l'agente eziologico è ritirato una volta che dalla dieta.

Il CD è caratterizzato dal malassorbimento derivando dalla ferita infiammatoria al piccolo mucosa intestinale e, una volta prolungato, può causare la malnutrizione. I sintomi classici del CD includono la diarrea, la perdita del peso e la malnutrizione.

Soltanto una piccola percentuale dei pazienti con il CD si presenta con i sintomi classici. Di conseguenza, lo spettro clinico del CD si è sviluppato molto più vasto di nel passato per includere i pazienti che non si presentano con i sintomi classici. Per i sintomi gastrointestinali non è raro per i sintomi iniziali essere non-gastrointestinale o, se presente, essere delicato o intermittente.

Gli studi hanno trovato la prevalenza del CD per essere altamente variabili da popolazione a popolazione. 1 la prevalenza allineare è stato difficile da accertare. I test di verifica disparati usati nella diagnosi del CD sono spesso la causa. Se i test di verifica clinici da solo sono usati nella determinazione della prevalenza, l'incidenza del CD è molto più bassa rispetto all'incidenza stabilita con i metodi sierologici. 1.2 metodo sierologico usando, l'incidenza del CD nella popolazione in genere è circa uno in 200.

La diagnosi del CD basata sui test di verifica clinici così può essere ingannevole e può condurre a serio fa ritardare nella diagnosi adeguata. Frequentemente, fa ritardare nella diagnosi estendono 10-13 anni dalla prima presentazione clinica dei sintomi.

L'omissione di diagnosticare il CD nella fase iniziale può predisporre un individuo alle complicazioni di lunga durata quali linfoma intestinale. L'incidenza di linfoma che presenta nel contesto del CD è difficile da accertare. Uno studio ha indicato l'incidenza di linfoma che coinvolge il tratto gastrointestinale nei pazienti con il CD per variare da 3.6% a 40%.³ In un altro studio recente, il CD è associato con il rischio significativamente elevato per linfoma intestinale, particolarmente per i non-Hodgkin's⁴. Una dieta glutine-libera (GFD) normalizza il mucosa e gli aiuti riduce il potenziale maligno.

L'esame istologico di piccola biopsia intestinale rimane la parità aurea per la diagnostica del CD, ma presenta le relative proprie limitazioni. Questi includono alcuni pazienti con il CD latente o persino attivo che può avere istopatologia normale.⁵

ESPGHAN modificato dei test di verifica include soltanto una singola biopsia con la remissione definita dei sintomi clinici su GFD⁶. La sierologia positiva ai tempi della diagnosi con la scomparsa su GFD contribuisce alla diagnosi. Le varie prove sierologiche per il CD includono

l'anticorpo anti-gliadina (AGA), l'anticorpo anti-endomysial (EMA), l'anticorpo anti-reticulina (ARA) e prove dell'anticorpo anti-tTG. Gli anticorpi a gliadina ed a tTG sono rilevati da ELISA, mentre gli anticorpi reticulina e di endomysium sono rilevati dall'immunofluorescenza indiretta. EMA sono indicatori molto specifici del CD. Tuttavia, la prova EMA è un metodo immunostochimico che richiede l'esperienza di reazioni di immunofluorescenza della lettura. Rosario ed altri ⁷ conclude che "EmA-IgA è 100 per cento sensibili e specifici nei pazienti IgA-sufficienti attivi e non trattati del CD una volta effettuati da un laboratorio stabilito."

Da identificazione di tTG come l'antigene endomysio, i metodi del ELISA sono stati descritti per la rilevazione degli anticorpi nei sieri dei pazienti con il CD. Il vantaggio dell'analisi dell'anticorpo anti-tTG è che è automatizzato e meno soggettivo che EMA. Per questo motivo, molti laboratori hanno scelto di usare il metodo dell'anticorpo tTG come il metodo di vagliatura. In questi laboratori, può essere l'unica analisi usata per rilevazione dei casi del CD. In vari studi sull'efficacia del metodo dell'anticorpo tTG per selezionare per il CD, la specificità e la sensibilità di questo metodo è stata trovata per variare da 90 a 95 %.

PRINCIPIO DELLA METODICA

L'antigene tTG ricombinante è adsorbito sulla parete dei pozzetti di una piastra microtiter di polistirene. La piastra è ostruita per ridurre le reazioni di non-specifico. I controlli, i calibratori, i sieri diluiti dei pazienti vengono distribuiti nei pozzetti corrispondenti, consentendo agli anticorpi anti-tTG eventualmente presenti di legarsi all'antigene adsorbito. L'eccesso di campione non legato viene allontanato mediante il lavaggio e successivamente si aggiunge a ciascun pozzetto un anticorpo anti-IgA umana marcato con un enzima. Questo l'enzima ha coniugato gli anticorpi si lega specificamente all'immunoglobulina umana del categoria IgA. Dopo ulteriore lavaggio per allontanare l'eccesso di anticorpi umane marcati con l'enzima, il substrato enzimatico specifico (pNPP) allora è aggiunto ai pozzetti. Dopo aver interrotto la produzione enzimatica del prodotto colorato si determina la presenza o l'assenza di anticorpi anti-tTG confrontando la densità ottica del campione con quella di una curva di calibrazione standard a 4 punti. I risultati sono riportati in modo semi-quantitativo in unità ELISA (EU/ml).

REAGENTI

Condizioni di conservazione

Conservare tutti i reagenti del kit a 2-8°C. Non congelare. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.

Non usare se il reagente non è chiaro.

Tampone di lavaggio: Aggiungere l'acqua distillata o deionizzata per il volume del 1L.

Microstrips: Usare una volta soltanto.

Precauzioni

Tutte le fonti umane di materiali usati nella preparazione dei controlli per questo prodotto sono state testate e sono risultate negative per la presenza di anticorpi anti-HIV, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV mediante metodi approvati dall'FDA. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali⁹ potenzialmente infettivi.

La sodio azide è usata come conservante. La sodio azide è un veleno e può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Lasciar scorrere grandi quantità di acqua, se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, per prevenire la formazione di azidi.

La sostituzione di componenti diversi da quelli forniti nel kit può causare risultati non attendibili. Usare le buone tecniche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e chimica.

Non usare dopo la data di scadenza.

Materiali forniti

ImmuLisa™ IgA-tTG ELISA **REF** 1144

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	MICROPLATE IgA-tTG	microstrips da 96 pozzetti individuali con antigene tTG
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A IgA-tTG * †	calibratore A (protezione verde), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B IgA-tTG * †	calibratore B (protezione viola), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C IgA-tTG * †	calibratore C (protezione blu), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D IgA-tTG * †	calibratore D (protezione gialla), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CONTROL + IgA-tTG * †	controllo positivo (protezione rossa), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CONTROL - * †	controllo negativo (protezione bianca), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	coniugato fos. alc. Colore rosa codificato colore.
1 x 60 ml	DIL *	diluente per campioni. Colorare l'azzurro codificato.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	substrato enzimatico. Contiene il pNPP. Proteggere da luce.
1 x 12 ml	STOP	soluzione bloccante
2	BUF WASH	tampone di lavaggio per 1 litro/fiala
*	Contiene < 0.1% NaN ₃	

Materiali richiesti ma non forniti

- Micropipette in grado di erogare volume di 5 – 1000 µL
- Puntali monouso per micropipette
- Provette per la diluizione dei sieri, volume 4mL
- Acqua distillata o deionizzata
- Lettore per piastre ELISA in grado di leggere a 405nm
- Bottiglia per tampone di lavaggio
- Temporizzatore
- Carta assorbente

Raccolta dei campioni

Questa tecnica deve essere usata con un campione di siero. Campioni con segni di contaminazione microbica, trattati con calore o contenenti particelle visibili non dovrebbero essere usati. Si dovrebbe evitare anche l'uso di sieri fortemente emolizzati o lipemici. Conservare i campioni a temperatura ambiente per non più di 8 ore. Se il test non può essere eseguito entro 8 ore, conservare i campioni in frigorifero a 2-8°C. Se il test non può essere eseguito entro 48 ore, oppure per la spedizione dei campioni, congelare a -20°C. Evitare il congelamento ripetuto e lo scioglimento.

METODICA

Prima di incominciare

- Prima di cominciare l'analisi ha letto con attenzione queste istruzioni.
- Portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (20-26°C) per 30 minuti. Materiali di ritorno al frigorifero subito dopo di uso.

- Preparare tutte le diluzioni degli esemplari pazienti prima di iniziare la prova.
- **Rimettere immediatamente la strisce inutilizzate nella busta contenente il materiale essicante e sigillarla bene per minimizzare l'esposizione all'umidità ambientale.**
- Lavaggio: La buona tecnica è critica. Una rondella automatizzata del piastra microtiter ELISA è suggerita.
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di trasporto delle 8 posizioni simultaneamente. Ciò accelera il processo e provvede ad un più tempo di incubazione dell'uniforme.
- La sincronizzazione attenta è importante. I periodi di incubazione cominciano dopo l'erogazione del reagentes.

Esecuzione del test

1. **TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) PRIMA DI INIZIARE IL TEST.**
2. Usare l'annotazione di protocollo per notare la posizione degli esemplari nel piastra microtiter. È buona pratica del laboratorio verificare gli esemplari due volte.
3. **Determinazione qualitativa:** usare soltanto Calibratore D.
Determinazione semi-quantitativa: usare Calibratori A - D come indicato nell'esempio qui sotto.

Determinazione qualitativa

A	BLANK	S5	○	○
B	NEG	S6	○	○
C	POS	S7	○	○
D	CAL D	S8	○	○
E	S1	S9	○	○
F	S2	S10	○	○
G	S3	S11	○	○
H	S4	S12	○	○
	1	2	3	4

Determinazione semi-quantitativa

A	BLANK	S2	○	○
B	NEG	S3	○	○
C	POS	S4	○	○
D	CAL A	S5	○	○
E	CAL B	S6	○	○
F	CAL C	S7	○	○
G	CAL D	S8	○	○
H	S1	S9	○	○
	1	2	3	4

4. Preparare una diluzione di **1:51** dei campioni mescolando **10 µl** dei campioni con **0.5 ml** di diluente per campioni.
 5. Distribuire **100 µL** di ciascuno dei calibratori, dei campioni diluiti, del Controllo Negativo e del Controllo Positivo nei pozzetti corrispondenti.
- Nota:** Includere una posizione con **100 µl** del diluente per campioni come spazio in bianco del reagente. Il valore zero del lettore del piastra microtiter dovrebbe essere regolato usando questa posizione. La capacità di assorbimento di questo pozzetto non dovrebbe essere più grande di 0.3.
6. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente su una superficie piana.
 7. Lavaggio: Aspirare completamente il contenuto di ciascun pozzetto. Distribuire **200-300µL** di soluzione di lavaggio in tutti i pozzetti e quindi aspirarla. Ripetere questa operazione per altre tre volte, per un totale di quattro lavaggi. Dopo l'ultimo lavaggio capovolgere la piastra e scuoterla fermamente su tovaglioli di carta assorbente per rimuovere eventuali residui di liquido. Non asciugarsi pozzetti completamente.
 8. Distribuire **100µL** di Coniugato in ciascun pozzetto.
 9. Incubare i pozzetti per 30 minuti.
 10. Lavaggio: Ripetere la procedura descritta al punto 7.
 11. Distribuire **100µL** di substrato enzimatico in ciascun pozzetto

12. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
13. Distribuire 100µL di soluzione bloccante in ogni pozzetto. Per l'aggiunta della soluzione bloccante mantenere la stessa sequenza e gli stessi tempi utilizzati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza (OD) entro 1 ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.
14. Leggere l'assorbanza (OD) di ciascun pozzetto a 405nm usando un singolo o lettore doppio del piastra microtiter di lunghezza d'onda contro l'insieme in bianco del reagente alla capacità di assorbimento zero.

RISULTATI

Calcolo dei risultati

Le concentrazioni dei campioni pazienti possono essere determinate da uno di due metodi:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

$$\frac{\text{OD di Esempiare}}{\text{OD di Calibratore D}} \times \text{EU/ml de Calibratore D} = \text{EU/ml di Esempiare}$$

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Capacità di assorbimento del diagramma di calibratores da A a D contro la loro concentrazione rispettiva su una carta da grafico lineare-lineare. Tracciare la concentrazione EU / ml sull'X-asse contro la capacità di assorbimento sull'Y-asse e disegnare la curva adatta migliore. Determinare le concentrazioni dei campioni pazienti dalla curva contro il relativo valore corrispondente di capacità di assorbanza. Vedere Figure 1 all'estremità di questo documento per una curva di campione.

Calibratore

I calibratori sono inclusi per fornire semi - la quantificazione e devono essere usati con ogni prova. Gli esemplari pazienti che contengono i livelli elevati dell'anticorpo possono dare i valori di capacità di assorbanza più grandi di quello del calibratore A. Per che determina i valori semiquantitativi esatti tali esemplari dovrebbe più ulteriormente essere diluito in modo da fanno parte della gamma della curva del calibratore una volta riprovati. Per determinazione EU / ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluzione.

Interpretazione

Le seguenti informazioni servono soltanto da guida nell'interpretazione dei risultati del laboratorio. Ogni laboratorio deve determinare i relativi propri valori normali.

Anti-tTG	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretación/Deutung/Interpretação

<20 EU/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

Limitazioni del test

Questa tecnica deve essere usata con un campione di siero. Campioni con segni di contaminazione microbica, trattati con calore o contenenti particelle visibili non dovrebbero essere usati. Si dovrebbe evitare anche l'uso di sieri fortemente emolizzati o lipemici. Non è possibile giungere alla diagnosi solo sulla base dei risultati del test TTG. Nei pazienti carenti di IgA, IgA-tTG può essere negativo.

VALORI

I valori previsti in una popolazione normale sono negativi (< 20 EU/ml per gli adulti ed i

bambini). Tuttavia, è stato determinato che alcuni individui apparentemente in buona salute e asintomatici potessero verificare il positivo ad anticorpi anti-tTG IgA.

L'incidenza degli anticorpi anti-tTG è stata studiata dai vari ricercatori ed i risultati sono ricapitolati in Table 1 all'estremità di questo documento.

L'incidenza ed i livelli degli anticorpi anti-tTG dipende dalla condizione di dieta. I livelli di questi anticorpi diminuiscono e finalmente diventeranno negativi in pazienti con il CD che sono su una dieta glutine-libera. Similmente, i livelli di questi anticorpi aumenteranno o gli anticorpi anti-tTG diventano positivi quando i pazienti con il CD che erano su una dieta glutine-libera ingerisce una dieta contenente glutine^{10, 11}.

Poichè ci sono parecchi anticorpi connessi con il CD, la procedura nella Figure 2 all'estremità di questo documento può servire da guida nell'interpretazione di vari risultati della prova per il CD. Alcuni ricercatori hanno adottato il metodo presentato nella Figure 3 per stabilire una diagnosi del CD.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONI

Il programma di utilità del ImmuLisa anti-tTG IgA Anticorpo ELISA è stato determinato paragonando i risultati a:

- a) un altro metodo disponibile in commercio del anti-tTG IgA Anticorpo ELISA e
- b) ImmuGlo anti-endomysial IFA Metodo

Gamma Normale: La gamma normale è stata stabilita esaminando 64 campioni del siero dai donatori apparentemente in buona salute ottenuti dal Red Cross. Il taglio è uguale il valore medio + 3 STD di questi campioni.

Comparativo Specificità e Sensibilità

- A. ImmuGlo™ EMA vs. ImmuLisa™ hu tTG IgA Anticorpi ELISA: Un totale di 274 campioni è stato esaminato a EMA usando il corredo di ImmuGlo ed i risultati sono stati paragonati al metodo ImmuLisa anti-hu tTG. I risultati sono ricapitolati in tabella 2.
- B. ImmuLisa™ anti-hu tTG IgA ELISA vs. other ELISA: Un totale di 74 campioni è stato esaminato sul corredo dell'anticorpo ImmuLisa e su un altro corredo commerciale. I risultati di questi compaiono in tabella 3.
- C. **Reattività Trasversale:** Un totale di 65 comandi di malattia è stato esaminato. Nessun sono stati trovati positivi.

Precisione:

Esemplari con le concentrazioni conosciute di anti-tTG IgA si sono analizzati in 10 repliche durante due settimane. Intra- e inter-analisi CV è stato calcolato. Vedere La Tabella 4.

Recupero

I campioni con le concentrazioni conosciute di IgA anti-tTG sono stati mescolati con le diluzioni adatte di un altro campione positivo con gli importi conosciuti di anti-tTG IgA. Anti-tTG IgA i livelli dell'anticorpo che dei campioni mixed sono stati determinati e dai valori ha ottenuto il recupero di percento calcolato. I risultati compaiono in Table 5.



ImmuLisa™
Anti-Transglutaminase
do Tecido (tTG)
Anticorpo
IgA ELISA

IVD

REF 1144 **IgA-tTG** 96 Determinations

ImmuLisa™ tTG IgA ELISA é um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção e semi-quantificação de anticorpos anti-tTG de IgA no soro humano, por ajuda no diagnóstico de doença celíaca (CD) e *dermatitis herpetiformis* (DH).

SUMÁRIO E EXPLANAÇÃO

O CD é uma doença autoimune ocorre em indivíduos suscetíveis após ter comido as grãos que contêm o gluten tal como o trigo, a cevada e o centeio. De muitas doenças autoimune, o CD é um do poucos onde o agente que causa a doença é sabido e a doença desaparece em seguida gluten é removida da dieta.

O CD é caracterizado pela inflamação à mucosa do intestine pequeno. Quando é prolongado pode causar o desnutrição. Os sintomas clássicos do CD incluem o diarreia, a perda do peso e o desnutrição.

Poucos pacientes do CD atuais com sintomas clássicos. Conseqüentemente, a população clínica do CD inclui agora os pacientes que não se apresentam com sintomas clássicos. No fato, os sintomas iniciais não podem ser gastrointestinal.

Os estudos encontraram a incidência do CD para ser altamente variáveis da população à população. Os números verdadeiros foram difíceis de verificar. Os critérios variando para o CD são frequentemente a causa. Se os critérios clínicos sozinho forem usados em determinar o CD, a incidência é muito mais baixa em comparação à incidência estabelecida por métodos serológicas. Usando métodos serológicas, a incidência do CD na população geral é aproximadamente 1 em 200.

O diagnóstico do CD baseado em critérios clínicos pode ser enganador e a causa séria atrasa no diagnóstico apropriado.

A falha diagnosticar o CD pode dispo um indivíduo às complicações a longo prazo tais como o lymphoma. A incidência do lymphoma que levanta-se no CD é difícil de verificar. Um estudo mostrou a incidência do lymphoma que envolve o intervalo gastrointestinal no CD para variar de 3.6% a 40%. Em um outro estudo recente, o CD é associado com o risco mais altamente para o lymphoma, especial para non-Hodgkin's. Uma dieta gluten-livre (GFD) normaliza a mucosa e as ajudas reduz o potencial.

A examinação <<histological>> do <<biopsy>> intestinal pequeno remanesce o padrão de ouro para diagnosticar o CD, mas tem suas próprias limitações. Alguns pacientes podem ter o <<histopathology>> normal.

Os critérios revisados ESPGHAN incluem somente um único biopsy com redução definitiva de sintomas clínicos em GFD. Positive na altura do diagnóstico com um resultado negativo depois que GFD contribui ao diagnóstico. Os vários testes serológicas incluem o anticorpos anti-gliadina (AGA), o anticorpos anti-endomisio (EMA), o anticorpos anti-reticulina (ARA) e do anti-tTG. AGA e o anti-tTG são detectados por ELISA. EMA e ARA são detectados por IFA. EMA são indicadores muito específicos do CD. Entretanto, o teste de EMA requer a experiência em reações do imuno fluorescência da leitura. Rosario et al concluem que "EmA-IgA tem 100 por cento sensível e o específico em pacientes IgA-suficientes ativos do CD quando executado por um laboratório estabelecido."

Desde a identificação do tTG como o antígeno endomísio, os métodos de ELISA foram descritos detectando anticorpos nos soro dos pacientes com CD. A vantagem do teste do anticorpos do anti-tTG é que está automatizada e mais menos subjetivo do que EMA. Para esta razão, muitos laboratórios têm decidido usar o método do anticorpos do tTG como o método de seleção. Nestes laboratórios, pode ser o único teste usado para o diagnóstico do CD. Nos estudos no eficácia do método do anticorpos do tTG à tela para o CD, o especificidade e a sensibilidade deste método foram encontrados para variar de 90% a 95%. O tTG humano foi descrito para melhorar a sensibilidade do teste do anticorpos do tTG para o CD.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os poços da microplaca de poliestireno, encontram-se revestidos com antígenos de tTG recombinante. A placa é obstruída para reduzir o emperramento não é específica. Os controles, calibradores e as amostras diluídas são pipetados nos diferentes poços, permitindo que os anticorpos específicos anti-tTG presentes se liguem ao antígeno imobilizado. Depois de proceder à lavagem dos poços, para retirar a amostra não ligada, adiciona-se o conjugado IgA anti humano marcado. Estes anticorpos ligam especificamente ao imunoglobulina humana da classe IgA. Depois da segunda lavagem, para retirar o excesso de conjugado, adiciona-se o substrato (pNPP) que provoca uma alteração da cor na presença do conjugado. Após adição da solução de paragem a presença ou ausência de anticorpos anti-tTG é determinada por comparação da densidade óptica da amostra com a densidade óptica dos 4 pontos da curva de calibração. Os resultados são apresentados semi-quantitativamente em unidades ELISA (EU/ml).

COMPOSIÇÃO DO DISPOSITIVO

Precauções particulares de conservação

Conservar todos os reagentes a 2-8° C. Não congelar. Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade indicada, quando armazenados e manipulados conforme descrito no protocolo. Não usar se o reagente não estiver desobstruído.

Tampão de lavagem: Adicionar a água destilada ou deionizada para o volume do 1L.

Micropoços: Usar uma vez somente.

Precauções

Todo o material de origem humana, utilizado na preparação dos controles para este produto foi testado e deu resultados negativos para testes aprovados pela FDA em relação a anticorpos anti HBs Ag, HIV e HCV. Contudo nenhum teste pode garantir com certeza absoluta a ausência destes anticorpos ou outros agentes infecciosos. Assim os controles e calibradores devem ser manipulados como material⁹ potencialmente infectante.

A azida de sódio é utilizada como conservante. Este produto é considerado venenoso e pode ser tóxico se for ingerido ou absorvido pela pele ou pelos olhos. Pode reagir com componentes de chumbo ou cobre das canalizações formando azidas metálicas explosivas. Por esta razão ao deitarmos fora os restos de reagentes devemos deixar correr água em quantidade suficiente para evitar a formação destas substâncias.

A Substituição de componentes do dispositivo pode originar resultados inconsistentes.

Usar técnicas de laboratório boas minimizar a contaminação microbiana e química.

Não usar após a data de expiração.

Material fornecido

ImmuLisa™ IgA-tTG ELISA **REF** 1144

Os jogos contêm reagentes suficientes para executar 96 determinações cada uma.

12 x 8	MICROPLATE IgA-tTG	96 micropoços partilhados, tTG
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A IgA-tTG * †	calibrador A (<i>tampão verde</i>), pronto para uso. Contém soro humano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B IgA-tTG * †	calibrador B (<i>tampão violeta</i>), pronto para uso. Contém soro humano.

1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C IgA-tTG * †	calibradore C (<i>tampão azul</i>), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D IgA-tTG * †	calibradore D (<i>tampão amarelo</i>), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	CONTROL + IgA-tTG * †	controle positivo (<i>tampão vermelho</i>), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	controle negativo (<i>tampão branco</i>), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 12 ml	IgA-CONJ ALKPHOS * †	conjugado fos. alc. Cor-de-rosa codificada cor.
1 x 60 ml	DIL *	diluyente de amostras. Azul codificado cor.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	substrato enzime. Contem pNPP. Proteger da luz.
1 x 12 ml	STOP	solução de parada
2	BUF WASH	tampão de lavagem do 1 litro/viale

* Contem < 0.1% NaN₃

Material necessário não fornecido com o kit

- Micropipetas de 5 - 1000 µl
- Pontas descartáveis para as micropipetas
- Tubos para diluições de 4 ml de volume
- Água destilada ou desionizada
- Fotometro para leitura de microplaca, com filtro de 405 nm
- Frasco para tampão de lavagem
- Temporizador
- Papel absorvente

Colheita da Amostra

Este procedimento deve ser efectuado com soro. As amostras de soro com contaminação bacteriana, que sofreram tratamento térmico ou contendo partículas visíveis não devem ser utilizadas. Amostras hemolizadas ou lipémicas devem ser evitadas.

Armazenar as amostras á temperatura ambiente apenas durante 8 horas. Se o teste não for efectuado em 8 horas, guardar as amostras a 2-8°C. Se o teste não for efectuado em 48 horas, ou se houver transporte da amostra, congelar a -20°C ou a temperatura inferior. Evitar congelar-se e aquecer-se repetidos.

MÉTODO

Antes de Iniciar

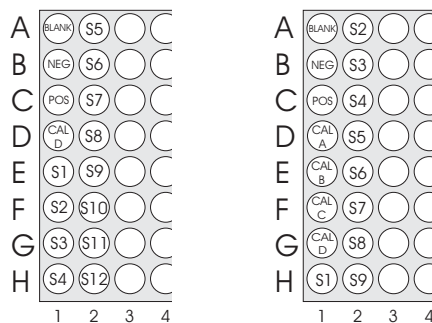
- Antes de começar o teste leu estas instruções com cuidado.
- Todos os componentes devem encontrar-se á temperatura ambiente (20-26°C) por 30 minutos antes de usar. Materiais do retorno ao refrigerador imediatamente depois do uso.
- Preparar todas as diluições dos espécimes pacientes antes de começar o teste.
- **Guardar imediatamente as restantes estripes na saqueta e selar convenientemente para minimizar a exposição ao vapor de água.**
- Lavagem: A técnica boa é crítica. Uma arruela automatizada do microplaca é recomendada.
- Usar uma pipeta capaz de entregar 8 posições simultaneamente. Isto apressa o processo e fornece-o por um tempo mais uniforme.

- O sincronismo cuidadoso é importante. Os períodos das incubações começam após ter dispensado líquidos.

Técnica

1. **ANTES DE INICIAR TODOS OS COMPONENTES DEVEM ENCONTRAR-SE À TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C).**
2. Usar o registro do protocolo anotar a posição dos espécimes no microplaca. É prática boa do laboratório testar espécimes na duplicata.
3. **Determinação qualitativa:** usar somente Calibrador D.
Determinação semi-quantitativa: usar Calibradores A - D como mostrado no exemplo abaixo.

Determinação qualitativa: Determinação semi-quantitativa:



4. Preparar uma diluição de **1:51** do espécime paciente misturando **10 µl** do espécime paciente com **0.5 ml** de diluente de amostras.
 5. Pipetar **100 µl** de cada um dos calibradores, das amostras diluídas, do controlo negativo e do controlo positivo para os poços.
- Nota:** Incluir uma posição com **100 µl** do diluente de amostras como um espaço em branco. O valor zero do leitor do microplaca deve ser ajustado usando esta posição. A absorvância deste micropoço não deve ser mais grande de 0.3.
6. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente.
 7. Lavagem: Aspirar os pocitos. Adicionar 200-300 µl de tampão e aspirar novamente. Repetir esta sequência mais 3 vezes num total de 4 lavagens. Após a última lavagem, inverter a placa em papel absorvente para retirar todo o líquido residual. Não secar micropoços completamente.
 8. Pipetar **100 µl** do conjugado em cada pocito.
 9. Incubar os poços durante 30 minutos à temperatura ambiente.
 10. Lavagem: Repetir o ponto 7.
 11. Dispensar **100 µl** do substrato enzime em cada pocito.
 12. Incubar durante 30 min, e à temperatura ambiente.
 13. Adicionar **100 µl** de solução de parada em cada pocito. Manter a mesma sequência para a adição da solução de parada, conforme a sequência anteriormente utilizada para a adição do substrato enzime. Ler a densidade optica (DO) no espaço de 1 hora após para a reacção.
 14. Ler a densidade optica (DO) a 405 nm no espaço usando um único ou leitor duplo do microplaca de encontro ao jogo em branco do reagente no absorvância zero.

RESULTADOS

Cálculo dos resultados

As concentrações das amostras pacientes podem ser determinadas por qualquer um de dois métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

DO Espécime

$$\frac{\text{DO Espécime}}{\text{DO Calibradore D}} \times \text{EU/ml Calibradore D} = \text{EU/ml Espécime}$$

2. DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA

A absorvância do lote de Calibradores A a D de encontro a sua concentração respectiva em um papel de gráfico linear-linear. Traçar a concentração EU / ml na X-linha central de encontro ao absorvância na Y-linha central e extrair a mais melhor curva apta. Determinar as concentrações das amostras pacientes da curva de calibradores a seu valor correspondente do absorvância. Ver Figure 1 na extremidade deste original para uma curva padrão.

Calibrador

Os calibradores são incluídos para fornecer semi -quantitativa e devem ser usados com cada teste. Os espécimes pacientes que contêm uns níveis mais elevados do anticorpos podem dar os valores do absorvância mais grandes do que aquele do Calibrador A. Para que determina valores semi-quantitativa exatos tais espécimes deve mais ser diluído assim que caem dentro da escala da curva do calibrador quando reexaminados. Para determinando EU / ml, multiplicar as unidades obtidas pelo fator da diluição.

Interpretação

A seguinte informação serve somente como uma guia na interpretação dos resultados do laboratório. Cada laboratório deve determinar seus próprios valores normais.

Anti-tTG	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/ Interpretación/Deutung/Interpretação
Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/ Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

Límites do Método

Este procedimento deve ser efectuado com soro. As amostras de soro com contaminação bacteriana, que sofreram tratamento térmico ou contendo partículas visíveis não devem ser utilizadas. Amostras hemolizadas ou lipémicas devem ser evitadas. O diagnóstico não deve ser efectuado somente com base no valor dos tTG. Em pacientes deficient de IgA, IgA-tTG pode ser negativo.

VALORES PREVISTOS

Os valores previstos em uma população normal são negativos (< 20 EU/ml para adultos e crianças). Entretanto, determinou-se que alguns indivíduos aparentemente saudáveis, no symptomatic podem testar o positivo para anticorpos anti-tTG IgA.

A incidência de anticorpos anti-tTG foi estudada por vários investigadores e os estudos são sumariados em Table 1 na extremidade deste original.

A incidência e os níveis de anticorpos anti-tTG são dependentes do status da dieta. Os níveis destes anticorpos diminuem e eventualmente tornar-se-ão negativos nos pacientes com CD que estão em uma dieta gluten- livre. Similarmente, os níveis destes anticorpos aumentarão ou os anticorpos anti-tTG tornam-se positivos quando os pacientes com CD que estavam em uma dieta gluten-livre consome uma dieta com gluten^{10, 11}.

Porque há diversos anticorpos associados com o CD, o algoritmo em Figure 2 na extremidade deste original pode servir como uma guia na interpretação de vários resultados de teste para o CD.

Alguns investigadores fizeram exame da aproximação apresentada em Figure 3 para estabelecer um diagnóstico do CD.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade do ImmuLisa anti-tTG IgA Anticorpos ELISA foi determinada comparando os resultados com:

- um outro método comercialmente disponível de anti-tTG IgA Anticorpos ELISA e
- ImmuGlo anti-endomisio IFA Método.

Escala Normal: A escala normal foi estabelecida testando 64 amostras do soro dos doadores aparentemente saudáveis obtidos do Red Cross. A interrupção iguala o valor

médio + 3 STD destas amostras.

Comparativo especificidade e sensibilidade

- A. ImmuGlo™ EMA vs. ImmuLisa™ hu tTG IgA Anticorpos ELISA: Um total de 274 amostras foi testado para EMA usando o jogo de ImmuGlo e os resultados foram comparados com o método de ImmuLisa anti-hu tTG. Os resultados são sumariados na tabela 2.
- B. ImmuLisa™ anti-hu tTG IgA ELISA vs. other ELISA: Um total de 74 amostras foi testado no jogo do anticorpos ImmuLisa e em um outro jogo comercial. Os resultados destes aparecem na tabela 3.
- C. Reactivity Transversal: Um total de 65 controles da doença foi testado. Nenhum foram encontrados positivos.

Precisão:

Espécimes com concentrações sabidas de anti-tTG IgA foram testados em 10 replicates sobre um período de duas semanas. Intra- e inter-assay CV foi calculado. Ver A Tabela 4.

Recuperação

As amostras com concentrações sabidas de IgA anti-tTG foram misturadas com as diluições apropriadas de uma outra amostra positiva com quantidades sabidas de anti-tTG IgA. Anti-tTG IgA os níveis do anticorpos que das amostras misturadas foram determinados e dos valores obteve a recuperação dos por cento calculada. Os resultados aparecem em Table 5.

REFERENCES•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI

1. Cooper BT, Holmes GK, Ferguson R, et al. Celiac disease and malignancy. *Medicine*; 1980, 59:249-261.
2. Sher KS, Jayanthi V, Probert CS, et al. Infertility, obstetric and gynecological problems in coeliac sprue. *Digestive Dis*; 1994, 12:186-190.
3. McFarlane XA, Bhalla AK, Reeves DE, et al. Osteoporosis in treated adult coeliac disease. *Gut*; 1995, 36:710-714.
4. Gobbi G, Bouquet F, Greco L, et al. Coeliac disease, epilepsy and cerebral calcifications. The Italian working group on coeliac disease and epilepsy. *Lancet*; 1992, 340:439-443.
5. Dietrich W, Ehnis T, Bauer M, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*; 1997, 3:797-801.
6. Phillips MA, Stewart BE, Quin Q, et al. Primary structure of keratinocyte transglutaminase. *Proc Natl Acad Sci*; 1990, 87:9333-9337.
7. Aschlimann D, Mosher D, Paulsson M, et al. Tissue transglutaminase and factor XIII in cartilage and bone remodelling. *Sem Thromb and Hemo*; 1996, 22:437-443.
8. Jones RA, Nicholas B, Mian S, et al. Reduced expression of tissue transglutaminase in a human endothelial cell line leads to changes in cell spreading, cell adhesion and reduced polymerization of fibronectin. *J Cell Sci*; 1997, 110:2461-2472.
9. Sulkanen S, Haltunen T, Laurila K, et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*; 1998, 115:1322-1328.
10. Dietrich W, Laag E, Schopper H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease; *Gastroenterology* 1998, 115:1317-1321.
11. Molberg O, McAdam S, Korner R. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T-cells in celiac disease. *Nature Medicine*; 1998, 4:713-717.
12. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health; 1993 (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
13. Dietrich W, Laag E, Bruckner-Tuderman et al. Antibodies to tissue transglutaminase as serologic markers in patients with dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol*; 1999, 113:133-136.

Figure 1. Sample Standard Curve

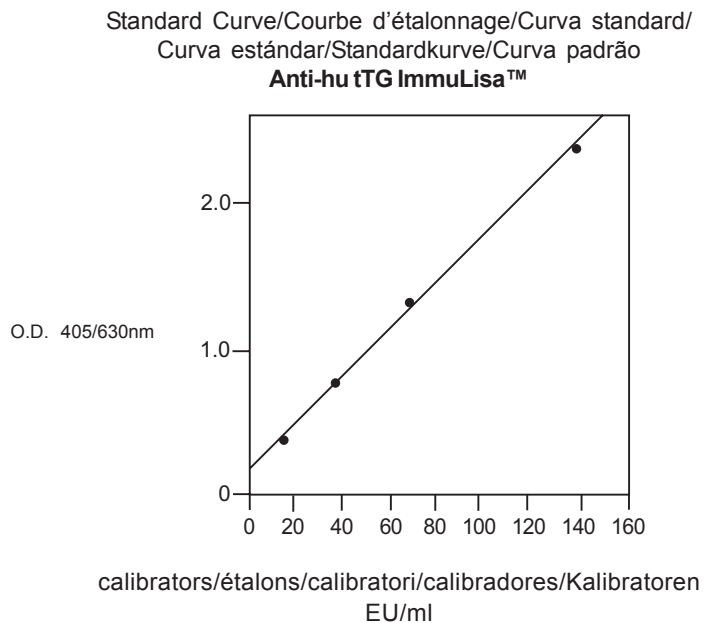


Table 1. Incidence of EMA and tTG Antibodies

Study Group	No.	EMA	tTG
Dermatitis herpetiformis	44		
on gluten diet	33	33 (100%)	33 (100%)
on gluten-restricted diet	11	0 (0%)	3 (27%)
Celiac Disease	58		
on gluten diet	34	34 (100%)	31 (91%)
on gluten-restricted diet	24	0 (0%)	1 (4%)
Controls	189	0 (0%)	0 (0%)
Pemphigus	80	0 (0%)	1 (1%)
Linear IgA dermatosis	3	0 (0%)	0 (0%)
Normal	106	0 (0%)	1 (1%)

Kumar V et al; Clin Immunol 2001; 98: 378-382

Figure 2: CD Diagnosis Algorithm

EMA	ARA	AGA		anti-tTG	Interpretation
		IgG	IgA		
+	+	+	+	+	Positive
+	+	-	+	+	Positive
+	+	-	-	+	Positive
+	-	+	+	+	Positive
+	-	-	-	+	CD – probable
-	+	+	+	+	CD – probable
-	-	+	+	+	CD – possible
-	-	+	-	-	CD – unlikely
-	-	-	+	-	CD – unlikely
-	-	-	-	-	Negative

Figure 3: Laboratory Testing Algorithm

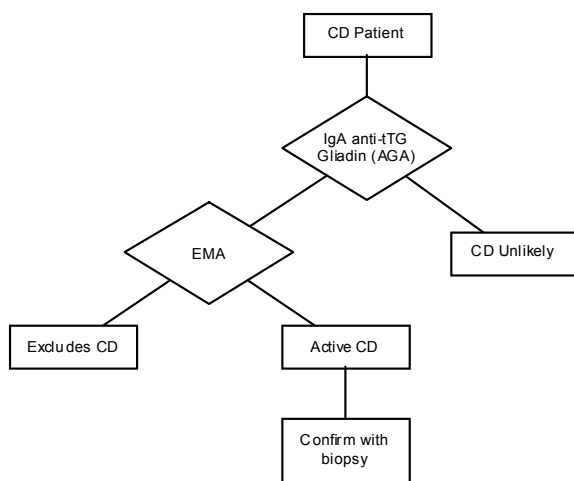


Table 2. ImmuLisa™ anti-hu tTG IgA vs ImmuGlo™ EMA

		anti-hu tTG IgA ELISA		
		Pos (+)	Neg (-)	Total (=)
ImmuGlo™ EMA	Pos (+)	109	3	112
	Neg (-)	5	157	162
	Total (=)	114	160	274

relative specificity/specificitate relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa: 97%
 relative sensitivity/sensibilitate relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivität/sensibilità relativa/sensibilidade relativa: 98%
 relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo: 94%

Table 3. ImmuLisa™ anti-hu tTG IgA vs other anti-hu tTG IgA ELISA

		ImmuLisa™ anti-hu tTG IgA ELISA		
		Pos (+)	Neg (-)	Total (=)
Other/Autre/Otro	Pos (+)	57	1	58
Anderes/Altri/Outro	Neg (-)	1	15	16
ELISA	Total (=)	58	16	74

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa: 97%
 relative sensitivity/sensibilité relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivität/sensibilità relativa/sensibilidade relativa: 96%
 relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo: 98%

Table 4. Precision

Anti-hu tTG IgA	Intra-plate	Inter-plate
	plaque/piastra/placa/Platte CV	plaque/piastra/placa/Platte CV
1. 199 EU/ml	6.2%	2.9%
2. 85 EU/ml	8.4%	6.5%
3. 41 EU/ml	15.6%	9.6%

Table 5. Recovery

	EU/ml added/supplémentaire/ aggiunto/agregado/ hinzugefügt/adicionado	EU/ml obtained/obtenu/ verificato/obtenido/ erreicht/obtido	% Recovery/Rétablissement/ Recupero/Recuperación/ Wiederaufnahme/Recuperação
1.	107.5	112	104.2%
2.	86	94.6	110%
3.	64	70.9	109.9%

For technical assistance please contact:

 **IMMCO Diagnostics, Inc.**
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
 Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.
 Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
 The Netherlands

REV.MAY2008

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
 www.emergogroup.com

Document No. PI4144