

EN



## Anti-Tissue Transglutaminase Antibody (tTG) IgA ELISA

IVD

### PRODUCT INSERT

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

REF 1157 IgA-tTG ELISA 96 Determinations

### INTENDED USE

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

### SUMMARY AND EXPLANATION

Celiac disease (CD) is a chronic digestive disorder caused by an autoimmune reaction against gluten, a protein found in wheat. It is characterized by damage to the absorptive villi and hyperplasia of the crypts in the small intestine. Symptoms include diarrhea, weight loss and anemia from malabsorption of iron and folic acid. Active CD increases risks of gastrointestinal malignancy<sup>1</sup>, infertility<sup>2</sup>, osteoporosis<sup>3</sup> and epilepsy and other neurological syndromes<sup>4</sup>. Celiac Disease is treated with a diet free of gluten.

CD is common in the European Caucasian population. As the disease is genetically mediated and the European and American Caucasian population share a common ancestry, actual prevalence of CD in the United States is suspected to be greater than reported in the past. Serological tests have been developed to aid in diagnosis of CD (i.e., anti-endomysial antibody (EMA), anti-reticulín antibody IFA's and anti-gliadin antibody ELISA). Recently, Dietrich et al<sup>5</sup> identified the antigen associated with EMA antigen to be tissue transglutaminase (tTG). This made it possible to develop an ELISA test for EMA antibodies that would be less subjective than typical immunofluorescence methods.

Transglutaminase (EC 2.3.2.13) are a diverse family of Ca<sup>2+</sup> dependent enzymes with distinct genes, structures, and biological functions<sup>6</sup>. These enzymes are ubiquitous and highly conserved across species<sup>7</sup>. Of all the human transglutaminases, tTG is most widely distributed. Although primarily an intracellular enzyme, tTG can be secreted from cells and accumulates in the extracellular matrix<sup>8</sup>. tTG may have a role in stabilizing the extracellular matrix, functioning as a highly efficient biological glue. Autoantibodies against tTG may disrupt or interfere with its normal functioning, resulting in the histological and pathological changes seen in CD. tTG is an important analyte for the diagnosis of CD<sup>5,9,10,11</sup>.

### PRINCIPLES OF PROCEDURES

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 materials<sup>12</sup>.

**WARNING** - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) 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 Inc.

Use good laboratory techniques to minimize microbial and chemical contamination. Do not use after expiration date.

### Materials Provided

Immulin<sup>TM</sup> IgA-tTG ELISA **REF** 1157









Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

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

\* Contains <0.1% NaN<sub>3</sub>

EN

### Symbols used on labels:

-  Lot number
-  Catalog number
-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions for use
-  In vitro diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

### 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.

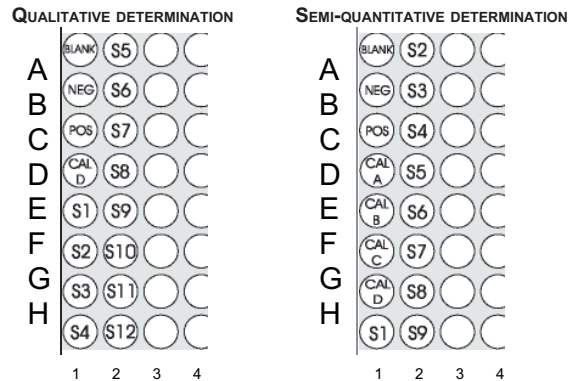
### PROCEDURE

#### Procedural Notes

- Before starting the assay read these instructions carefully.
- Bring all reagents and samples to room temperature (20-26°C) for 30 minutes. Return materials to refrigerator immediately after use.
- Prepare all dilutions of the patient specimens before starting the test.
- **Immediately return unused strips to the pouch containing desiccants and seal securely to minimize exposure to water vapor.**
- Wash step: Good technique is critical. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- Careful timing is important. Incubation periods begin after dispensing reagents.

### Assay procedure

1. **ALL REAGENTS MUST BE BROUGHT TO ROOM TEMPERATURE (20-26°C) PRIOR TO BEGINNING THE ASSAY.**
2. Label protocol record to indicate specimen placement in the microplate. It is good laboratory practice to test specimens in duplicate.
3. **Qualitative determination:** use only Calibrator D.  
**Semi-quantitative determination:** use Calibrators A - D as shown in the example below.



4. Prepare a **1:51** dilution of the patient specimen by mixing **10 µl** of the patient specimen with **0.5 ml** of Serum Diluent.
5. Add **100 µl** of Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient specimens to the appropriate microwells indicated on the protocol record. 3  
**Note:** Include one well with **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank. The absorbance of this well should not be greater than 0.3.
6. Incubate **30 minutes** ( $\pm$  5 minutes) at room temperature on a level surface.
7. Wash step: Thoroughly aspirate the contents of each well. Add 200-300µL of the **reconstituted** wash buffer to all wells then aspirate. Repeat this sequence thrice more for a total of four washes. Invert the plate and tap it on absorbent material to remove any residual fluid after the last wash. Do not dry wells completely.
8. Add 100µL of the Conjugate to each well.
9. Incubate the wells for 30 minutes.
10. Wash step: Repeat step 7.
11. Add 1 00µL of Enzyme Substrate to each well.
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:

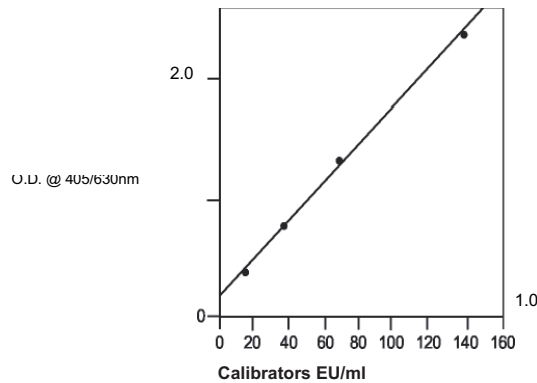
**1. QUALITATIVE DETERMINATION**

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

**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.

**Anti-tTG IgA 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	Interpretation
<20 EU/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Borderline
>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 on page 42.

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 ingest a gluten-containing diet<sup>9,10</sup>.

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

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

Normal Range: A total of 213 samples were tested. Of these, 64 were normal blood donors and 149, obtained from a reference lab, tested negative for endomysial antibodies. Of these 213 samples tested for antibodies to tTG, only 3 were tested positive, providing a 99% specificity of the assay.

#### Comparative Specificity and Sensitivity

A. Endomysial Antibodies vs. Immulisa™ tTG IgA Antibody ELISA: A total of 244 samples were tested for antibodies to endomysium using ImmuGlo™ anti-endomysial antibody kit and the results of anti-endomysial antibodies were compared with Immulisa™ anti-tTG IgA ELISA method. The results are summarized below:

		Immco™ anti-tTg IgA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Immco™ EMA	POS (+)	86	9	95
	NEG (-)	1	148	149
	TOT (=)	87	157	244

relative specificity: 96%  
relative sensitivity: 91%  
relative agreement: 99%

B. Immulisa™ anti-tTG ELISA vs. Another Commercial anti-tTG IgA ELISA Method: A total of 137 samples were tested on Immulisa™ anti-tTG IgA antibody kit and another commercially available anti-tTG IgA kits. The results were as follows:

		Immco™ anti-tTg IgA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other ELISA	POS (+)	77	5	82
	NEG (-)	1	54	55
	TOT (=)	78	59	137

relative specificity: 95%  
relative sensitivity: 91%  
relative agreement: 98%

EN

C. Cross Reactivity: A total of 30 samples, 10 each positive for antinuclear, anti-basement membrane zone (BMZ) and anti-intercellular (IC) antibodies were tested for anti-tTG IgA antibodies. 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 as follows:

<b>Anti-tTG IgA</b>	<b>Intra-plate CV</b>	<b>Inter-plate CV</b>
1. 186 EU/ml	5.3%	4.9%
2. 118 EU/ml	2.3%	4.9%
3. 51 EU/ml	9.2%	7.4%

**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 are as follows:

	<b>EU/ml added</b>	<b>EU/ml obtained</b>	<b>% Recovery</b>
1.	151	162	107%
2.	126	140	111%



## Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgA κατά της ιστικής τρανσγλουταμινάσης (tTG)

IVD

### ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1157 Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgA κατά της ιστικής τρανσγλουταμινάσης (tTG) 96 Προσδιορισμοί

#### ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσοφθητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των IgA αντισωμάτων κατά της ιστικής τρανσγλουταμινάσης σε ορό ανθρώπου, ως βοήθημα για τη διάγνωση κοιλιοκάκης.

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η κοιλιοκάκη (ΚΚ) είναι μια χρόνια γαστρεντερική διαταραχή που προκαλείται από μία αυτοάνοση αντίδραση στη γλουτένη, μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στο σιτάρι. Χαρακτηρίζεται από βλάβη στις απορροφητικές λάχνες και υπερπλασία των κρυπών του λεπτού εντέρου. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν διάρροια, απώλεια βάρους και αναιμία λόγω δυσαπορρόφησης σιδήρου και φολικού οξέος. Η ενεργή ΚΚ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης κακοηθειών της γαστρεντερικής οδού<sup>1</sup>, στειρότητας<sup>2</sup>, οστεοπόρωσης<sup>3</sup> και επιληψίας και άλλων νευρολογικών συνδρόμων<sup>4</sup>. Η κοιλιοκάκη θεραπεύεται με δίαιτα ελεύθερη γλουτένης.

Η ΚΚ είναι κοινή στον καυκάσιο πληθυσμό της Ευρώπης. Καθώς η νόσος έχει γενετικό υπόβαθρο και οι καυκάσιοι πληθυσμοί της Ευρώπης και της Αμερικής έχουν κοινούς προγόνους, πιθανολογείται ότι ο πραγματικός επιπολασμός της ΚΚ στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι μεγαλύτερος από ότι έχει αναφερθεί στο παρελθόν. Έχουν αναπτυχθεί ορολογικές εξετάσεις που υποβοηθούν τη διάγνωση της ΚΚ (δηλαδή, αντι-ενδομυικά αντισώματα (EMA), αντισώματα ανοσοφθορισμού κατά της ρετικουλίνης και αντισώματα ELISA κατά της γλιαδίνης). Πρόσφατα, οι Dietrich et al<sup>5</sup> αναγνώρισαν την ιστική τρανσγλουταμινάση (tTG) ως το αντιγόνο που σχετίζεται με το αντιγόνο EMA. Έτσι, έγινε δυνατή η ανάπτυξη μιας ανάλυσης ELISA για τα αντισώματα EMA, η οποία θα ήταν λιγότερο υποκειμενική από τις συνήθεις μεθόδους ανοσοφθορισμού.

Οι τρανσγλουταμινάσες (ΕΕ 2.3.2.13) είναι μια ανομοιογενής οικογένεια ενζύμων εξαρτώμενων από το Ca<sup>+2</sup> με ξεχωριστά γονίδια, δομές και βιολογικές λειτουργίες<sup>6</sup>. Τα ένζυμα αυτά είναι διαδεδομένα και συντηρημένα σε μεγάλο βαθμό στα διάφορα είδη<sup>7</sup>. Από όλες τις ανθρώπινες τρανσγλουταμινάσες, η tTG εμφανίζει την ευρύτερη κατανομή. Μολονότι είναι κυρίως ενδοκυτταρικό ένζυμο, η tTG μπορεί να εκκριθεί από τα κύτταρα και να συσσωρευθεί στην εξωκυττάρια ουσία<sup>8</sup>. Η tTG ενδέχεται να παίζει ρόλο στη σταθεροποίηση της εξωκυττάριας ουσίας, λειτουργώντας ως μια πολύ αποτελεσματική βιολογική κόλλα. Αυτοαντισώματα κατά της tTG ενδέχεται να παρέμβουν στη φυσιολογική της λειτουργία ή να την αποδιοργανώσουν, προκαλώντας τις ιστολογικές και παθολογικές μεταβολές που παρατηρούνται στην ΚΚ. Η tTG είναι μια σημαντική αναλυόμενη ουσία για τη διάγνωση της ΚΚ<sup>5,9,10,11</sup>.

#### ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Το αντιγόνο της ιστικής τρανσγλουταμινάσης δεσμεύεται στις κυψελίδες ενός πλακιδίου μικροκυψελίδων από πολυστυρένιο και, στη συνέχεια, τα σημεία που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται, ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και οι αραιωμένοι οροί των ασθενών προστίθενται σε ξεχωριστές κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των αντισωμάτων αντι-tTG στο καθηλωμένο αντιγόνο. Το δείγμα που δε δεσμεύτηκε εκπλένεται και προστίθεται σε κάθε κυψελίδα ένα σημασμένο με ένζυμο, συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgA. Αυτά τα συζευγμένα με ένζυμο αντισώματα δεσμεύονται ειδικά στην ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη της τάξης IgA. Αφού εκπλυθούν τα τυχόν μη δεσμευμένα συζευκτικά αντισώματα, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (pNPP). Μετά τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης, η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, μετράται με ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

### Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.** Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

### Προφυλάξεις

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις απαιτούμενες από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA) εξετάσεις. Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έκχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών <sup>12</sup>.

**ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ** – Το αζίδιο του νατρίου (NaN<sub>3</sub>) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

**Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του kit.** Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc.

Να χρησιμοποιείτε τις ορθές εργαστηριακές τεχνικές προκειμένου να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος μικροβιακής και χημικής μόλυνσης. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

### Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgA κατά της ιστικής τρανσγλουταμινάσης (tTG) ImmuLISA™ **REF** 1157

Κάθε kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.









12 x 8	<b>MICROPLATE tTG</b>	<b>Πλακίδιο</b> ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με το αντιγόνο tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR A tTG</b> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής A</b> (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR B tTG</b> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής B</b> (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR C tTG</b> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής C</b> (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR D tTG</b> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής D</b> (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL + tTG</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα θετικού ελέγχου</b> (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για την tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα αρνητικού ελέγχου</b> (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.

EL

1 x 12 ml	<b>IgA-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση</b> . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>αραιωτικό διάλυμα ορού</b> . Χρώματος μπλε.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>ενζυμικό υπόστρωμα</b> . Περιέχει p-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). <b>Να προστατεύεται από το φως</b> .
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα τερματισμού</b> .
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης</b> . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

\* Περιέχει < 0,1% NaN<sub>3</sub>

#### Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

-  Αριθμός παρτίδας
-  Αριθμός καταλόγου
-  Ημερομηνία λήξης
-  Θερμοκρασία αποθήκευσης
-  Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης
-  In vitro διαγνωστική χρήση
-  Κατασκευαστής
-  Αριθμός αναλύσεων

#### Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικό χαρτί
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

#### ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι

περισσότερο από μία εβδομάδα. Για πιο μακροχρόνια φύλαξη τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### Σημειώσεις της διαδικασίας

- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση διαβάστε προσεκτικά αυτές τις οδηγίες.
- Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-26°C) επί 30 λεπτά. Επιστρέψτε τα υλικά στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Προετοιμάστε όλες τις αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών προτού ξεκινήσετε την ανάλυση.
- **Επιστρέψτε αμέσως τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες στη θήκη με τα αποξηραντικά και σφραγίστε την ασφαλώς, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η έκθεση σε υδρατμούς.**
- Στάδιο έκπλυσης: είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής. **Συνιστάται η χρήση μιας αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό, επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Η προσεκτική τήρηση των χρόνων είναι σημαντική. Οι περίοδοι επώασης ξεκινούν μετά τη χορήγηση των αντιδραστηρίων.

### Διαδικασία της μεθόδου

1. **ΟΛΑ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΦΤΑΣΟΥΝ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ (20-26°C) ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.**
2. Σημάνετε το αρχείο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στο πλακίδιο. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.
3. **Ποιοτικός προσδιορισμός:** χρησιμοποιήστε μόνο το Βαθμονομητή D.  
**Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός:** χρησιμοποιήστε τους Βαθμονομητές A – D, όπως φαίνεται στο παρακάτω παράδειγμα.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ		ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ	
A	BLANK \$5	BLANK \$2	
B	NEG \$6	NEG \$3	
C	POS \$7	POS \$4	
D	CAL D \$8	CAL A \$5	
E	\$1 \$9	CAL B \$6	
F	\$2 \$10	CAL C \$7	
G	\$3 \$11	CAL D \$8	
H	\$4 \$12	\$1 \$9	
	1 2 3 4	1 2 3 4	

4. Προετοιμάστε μια αραιώση του δείγματος του ασθενούς σε αναλογία **1:51**, αναμιγνύοντας **10 μl** του δείγματος ασθενούς με **0,5 ml** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
5. Προσθέστε **100 μl** βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενούς στις κατάλληλες μικροκυψελίδες που υποδεικνύονται στο αρχείο του πρωτοκόλλου. 3  
**Σημείωση:** Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου. Η απορρόφηση αυτής της κυψελίδας δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,3.

EL

6. Επλώστε επί **30 λεπτά** ( $\pm$  5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου, επάνω σε μια επίπεδη επιφάνεια.
7. Στάδιο έκπλυσης: Αναρροφήστε σχολαστικά το περιεχόμενο κάθε κυψελίδας. Προσθέστε 200-300μL του **αναασυσταθέντος** ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και έπειτα αναρροφήστε το. Επαναλάβετε αυτή την ακολουθία ενεργειών άλλες τρεις φορές, ώστε να πραγματοποιήσετε ένα σύνολο τεσσάρων εκπλύσεων. Αναστρέψτε το πλακίδιο και κτυπήστε το ελαφρά επάνω σε απορροφητικό υλικό ώστε να απομακρυνθεί τυχόν υπολειπόμενο υγρό από την τελευταία έκπλυση. Μην αποξηραίνετε πλήρως τις κυψελίδες.
8. Προσθέστε 100 μL συζευκτικού αντισώματος σε κάθε κυψελίδα.
9. Επλώστε τις κυψελίδες επί 30 λεπτά.
10. Στάδιο έκπλυσης: Επαναλάβετε το στάδιο 7.
11. Προσθέστε 100 μL ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα.
12. Επλώστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Προσθέστε 100 μL διαλύματος τερματισμού σε κάθε κυψελίδα. Διατηρήστε την ίδια σειρά και τους ίδιους χρόνους στην προσθήκη διαλύματος τερματισμού, όπως και στην προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου. Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος 405 nm, εντός μίας ώρας από τον τερματισμό της αντίδρασης.
14. Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος 405 nm, χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος, έναντι του τυφλού αντιδραστηρίου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

#### **Έλεγχος ποιότητας**

Βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστηρίου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστηρίου πρέπει να είναι  $<0,3$ . Ο βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης  $>1,0$ , διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή  $<20$  EU/ml. Εάν η ανάλυση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων κατά της ανθρώπινης tTG. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο. Οι αναλύσεις των δειγμάτων που δίνουν οριακές τιμές συνιστάται να επαναλαμβάνονται με φρέσκο δείγμα που λαμβάνεται σε μεταγενέστερη ημερομηνία, προκειμένου να διασφαλίζεται η ακρίβεια.

#### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

##### **Υπολογισμοί**

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων του ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

##### **1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ**

Απ/ση εξεταζόμ. δείγματος

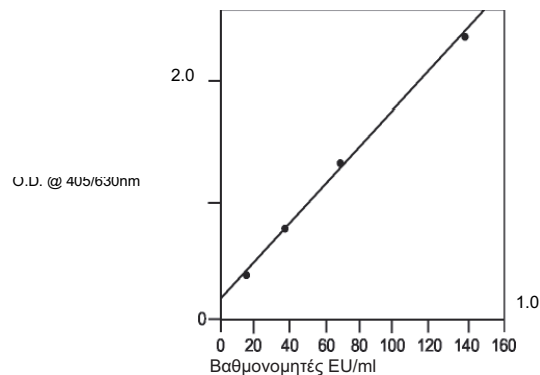
----- X EU/ml του Βαθμονομητή D = EU/ml

Απορ/ση Βαθμονομ. D

##### **2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ**

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών A έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε EU/ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης τους.

### Τυπική καμπύλη αντισωμάτων IgA κατά της tTG



### Βαθμονομητής

Οι βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για να εξυπηρετήσουν τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή Α. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν επί το συντελεστή αραιώσης.

### Ερμηνεία

Οι παρακάτω πληροφορίες παρέχονται μόνον ως οδηγός για την ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

Τιμή αντι-tTG	Ερμηνεία
<20 EU/ml	Αρνητικό (-)
20 – 25 EU/ml	Όριο
>25 EU/ml	Θετικό (+)

### ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η μέθοδος προσδιορισμού αντισωμάτων IgA αντι-tTG Immulisa™ δεν θα πρέπει να εκτελείται σε δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, σε μολυσμένα από μικρόβια ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για την εξέταση δειγμάτων ορού ανθρώπου. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται υποβοηθούν μόνο τη διάγνωση και δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται από μόνα τους ως διαγνωστικά. Σε ασθενείς με ΚΚ που εμφανίζουν ανεπάρκεια σε IgA, ο προσδιορισμός αντισωμάτων αντι-tTG ενδέχεται να είναι αρνητικός.

### ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Οι αναμενόμενες τιμές σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρνητικές (<20 EU/ml για ενήλικες και παιδιά). Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι ορισμένα ασυμπτωματικά, φαινομενικά υγιή άτομα, ενδέχεται να βρεθούν θετικά σε αντισώματα IgA αντι-tTG.

Η συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων αντι-tTG έχει μελετηθεί από διάφορους ερευνητές και τα ευρήματα συνοψίζονται στον Πίνακα 1, στη σελίδα 42.

Η συχνότητα εμφάνισης και τα επίπεδα των αντισωμάτων αντι-tTG εξαρτώνται από τη διατροφή. Τα επίπεδα αυτών των αντισωμάτων μειώνονται και τελικά γίνονται αρνητικά σε ασθενείς με ΚΚ, οι οποίοι ακολουθούν δίαιτα ελεύθερη γλουτένης. Παρομοίως, τα επίπεδα αυτών των αντισωμάτων θα αυξηθούν ή τα επίπεδα των αντισωμάτων αντι-tTG θα γίνουν θετικά, όταν οι ασθενείς με ΚΚ που ακολουθούσαν δίαιτα ελεύθερη γλουτένης, περάσουν σε δίαιτα που περιέχει γλουτένη<sup>9,10</sup>.

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ**

Η χρησιμότητα της μεθόδου ELISA για αντισώματα IgA κατά της ιστικής τρανσγλουταμινάσης Immulisa™ προσδιορίστηκε συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με:

- α) μια άλλη μέθοδο αντισωμάτων IgA αντι-tTG για ELISA που διατίθεται στο εμπόριο και
- β) τη μέθοδο ανοσοφθορισμού ImmuGlo™ με αντι-ενδομυϊκά αντισώματα.

Φυσιολογικό εύρος: Ελέγχθηκε ένα σύνολο 213 δειγμάτων. Από αυτά, τα 64 προέρχονταν από φυσιολογικούς αιμοδοτές και τα 149, τα οποία προήλθαν από ένα εργαστήριο αναφοράς, βρέθηκαν αρνητικά σε έλεγχο για ενδομυϊκά αντισώματα. Από αυτά τα 213 δείγματα που ελέγχθηκαν για την παρουσία αντισωμάτων κατά της tTG, μόνο 3 βρέθηκαν θετικά, αποδίδοντας έτσι ειδικότητα της μεθόδου ίση με 99%.

**Συγκριτική ειδικότητα και ευαισθησία**

A. Ενδομυϊκά αντισώματα έναντι της μεθόδου ELISA για αντισώματα IgA κατά της tTG Immulisa™: Ελέγχθηκε ένα σύνολο 244 δειγμάτων για την παρουσία αντισωμάτων κατά του ενδομυϊού χρησιμοποιώντας το κιτ αντι-ενδομυϊκών αντισωμάτων ImmuGlo™ και τα αποτελέσματα των αντι-ενδομυϊκών αντισωμάτων συγκρίθηκαν με τη μέθοδο ELISA με αντισώματα IgA αντι-tTG Immulisa™. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω:

		<b>Αντισώματα IgA αντι-tTg Immco™</b>		
		<b>Θετικά (+)</b>	<b>Αρνητικά (-)</b>	<b>Σύνολο (=)</b>
<b>Immco™</b>	<b>Θετικά (+)</b>	86	9	95
<b>EMA</b>	<b>Αρνητικά (-)</b>	1	148	149
	<b>Σύνολο (=)</b>	87	157	244

σχετική ειδικότητα: 96%  
σχετική ευαισθησία: 91%  
σχετική συμφωνία: 99%

B. Μέθοδος ELISA αντι-tTG Immulisa™ έναντι μιας άλλης μεθόδου για αντισώματα IgA αντι-tTG του εμπορίου: Ένα σύνολο 137 δειγμάτων ελέγχθηκαν με το κιτ αντισωμάτων IgA αντι-tTG Immulisa™ και με ένα άλλο κιτ αντισωμάτων IgA αντι-tTG που διατίθεται στο εμπόριο. Τα αποτελέσματα ήταν ως εξής:

		<b>Αντισώματα IgA αντι-tTg Immco™</b>		
		<b>Θετικά (+)</b>	<b>Αρνητικά (-)</b>	<b>Σύνολο (=)</b>
<b>Άλλη</b>	<b>Θετικά (+)</b>	77	5	82
<b>ELISA</b>	<b>Αρνητικά (-)</b>	1	54	55
	<b>Σύνολο (=)</b>	78	59	137

σχετική ειδικότητα: 95%  
σχετική ευαισθησία: 91%  
σχετική συμφωνία: 98%

Γ. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα: Ένα σύνολο 30 δειγμάτων, εκ των οποίων 10 ήταν θετικά σε αντιπυρηνικά αντισώματα, 10 ήταν θετικά σε αντισώματα ζώνης βασικής μεμβράνης (BMZ) και 10 ήταν θετικά σε ενδοκυτταρικά αντισώματα (IC), ελέγχθηκαν για την παρουσία αντισωμάτων IgA αντι-tTG. Δεν βρέθηκε κανένα θετικό.

**Ακρίβεια:**

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων IgA αντι-tTG αναλύθηκαν σε 10 αντίγραφα σε μια περίοδο δύο εβδομάδων. Υπολογίστηκαν οι συντελεστές ποικιλότητας (CV) εντός σειράς και μεταξύ σειρών, ως εξής:

EL

<b>Αντισώματα IgA αντι-tTG</b>	<b>Εντός πλακιδίου CV</b>	<b>Μεταξύ πλακιδίων CV</b>
1. 186 EU/ml	5,3%	4,9%
2. 118 EU/ml	2,3%	4,9%
3. 51 EU/ml	9,2%	7,4%

#### **Ανάκτηση:**

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων IgA αντι-tTG αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις ενός άλλου θετικού δείγματος με γνωστές ποσότητες αντισωμάτων IgA αντι-tTG. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα αντισωμάτων IgA αντι-tTG των αναμιχθέντων δειγμάτων και από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η επί τοις εκατό ανάκτηση. Τα αποτελέσματα ήταν ως εξής:

	<b>προστιθέμενα EU/ml</b>	<b>ληφθέντα EU/ml</b>	<b>% ανάκτηση</b>
1.	151	162	107%
2.	126	140	111%

ES



## Ensayo ELISA para anticuerpos anti transglutaminasa tisular (tTG) IgA

IVD

PROSPECTO

REF 1157 ELISA para tTG-IgA 96 análisis

### USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección y semicuantificación de anticuerpos anti transglutaminasa IgG humana en suero humano como ayuda en el diagnóstico de deficiencia de IgA en pacientes con enfermedad celíaca.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La enfermedad celíaca (EC) es un trastorno digestivo crónico provocado por una reacción autoinmune al gluten, una proteína del trigo. Se caracteriza por lesiones en las vellosidades intestinales e hiperplasia de las criptas del intestino delgado. Los síntomas incluyen diarrea, pérdida de peso y anemia por malabsorción del hierro y del ácido fólico. La EC aumenta el riesgo de patologías gastrointestinales malignas<sup>1</sup>, infertilidad<sup>2</sup>, osteoporosis<sup>3</sup>, epilepsia y otros síndromes neurológicos<sup>4</sup>. La enfermedad celíaca se trata con una dieta libre de gluten.

La EC es común en la población europea de raza blanca. Es una enfermedad mediada genéticamente y, dado que la población blanca europea y norteamericana tienen una ascendencia común, la prevalencia actual de la EC en los Estados Unidos podría ser superior a lo registrado en el pasado. Los análisis serológicos se desarrollaron para ayudar en el diagnóstico de EC [por ejemplo anticuerpos antiendomisiales (EMA), IFA para anticuerpos antireticulina, ELISA para anticuerpos antigliadina]. Recientemente, Dietrich *et al*<sup>5</sup> identificaron el antígeno asociado al antígeno EMA como transglutaminasa tisular (tTG), y esto hizo posible desarrollar un ensayo ELISA para anticuerpos EMA menos subjetivo que los métodos tradicionales de inmunofluorescencia.

Las transglutaminasas (EC 2.3.2.13) son una familia diversificada de enzimas dependientes de  $Ca^{+2}$  con diferentes genes, estructuras y funciones biológicas<sup>6</sup>. Estas enzimas son ubicuas y altamente conservadas a través de las especies<sup>7</sup>. De todas las transglutaminasas humanas, la tTG es la más ampliamente distribuida. Si bien es principalmente una enzima intracelular, la tTG puede ser segregada por las células y acumularse en la matriz extracelular<sup>8</sup>. La tTG puede jugar un papel en la estabilización de la matriz extracelular, funcionando como una cola biológica sumamente eficiente. Los anticuerpos anti tTG pueden alterar o interferir en su funcionamiento normal, dando como resultados los cambios histológicos y patológicos que se observan en la EC. Los anticuerpos anti tTG son un analito importante en el diagnóstico de EC<sup>5,9,10,11</sup>.

### PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El antígeno transglutaminasa tisular se une a los pocillos de una placa de polistireno; a continuación se bloquean los puntos que no han reaccionado para reducir las uniones no específicas. Controles, calibradores y muestras de suero de los pacientes se añaden en pocillos separados, permitiendo que los anticuerpos anti tTG presentes se unan al antígeno inmovilizado. Las muestras no unidas se eliminan mediante lavado y a cada pocillo se agrega un conjugado de IgA antihumana marcado con enzima. Estos anticuerpos conjugados con enzima se ligan específicamente a la inmunoglobulina humana de clase IgA. Después de eliminar por lavado todo el conjugado que no se hubiera unido, se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP). La presencia de anticuerpos anti-hu tTG se detecta por un cambio de color producido por la conversión del sustrato pNPP. Se detiene la reacción y la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, se lee con espectrofotómetro a 405 nm. Los resultados se expresan en unidades ELISA por mililitro (EU/ml).

### REACTIVOS

#### Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.** No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C). Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya

ES

el tampón de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

### Precauciones

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales<sup>12</sup>.

ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

**Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto.** No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc.

Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

### Material suministrado

ELISA para tTG IgA ImmuLisa™ **REF** 1157

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>tTG</b>	<b>Microplaca</b> con micropocillos individuales separables recubiertos con antígeno tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR A</b>   <b>tTG</b> *	<b>Calibrador A</b> listo para usar ( <i>tapa verde</i> ). Suero humano con anticuerpos anti-tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR B</b>   <b>tTG</b> *	<b>Calibrador B</b> listo para usar ( <i>tapa morada</i> ). Suero humano con anticuerpos anti-tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR C</b>   <b>tTG</b> *	<b>Calibrador C</b> listo para usar ( <i>tapa azul</i> ). Suero humano con anticuerpos anti-tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR D</b>   <b>tTG</b> *	<b>Calibrador D</b> listo para usar ( <i>tapa amarilla</i> ). Suero humano con anticuerpos anti-tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL +</b>   <b>tTG</b> *	<b>Control positivo</b> listo para usar ( <i>tapa roja</i> ). Contiene suero humano positivo a tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Control negativo</b> listo para usar ( <i>tapa blanca</i> ). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	<b>IgA-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	<b>Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina</b> listo para usar. Color rosado.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente de suero</b> listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato enzimático</b> listo para usar. Contiene pNPP. Protéjase de la luz.

ES

1 x 12 ml **STOP**

**Solución Stop lista para usar.**

2 x **BUF WASH**

**Tampón de lavado en polvo.** Reconstituir cada unidad hasta un litro.


\* Contiene <0.1%  $\text{NaN}_3$

#### **Símbolos utilizados en las etiquetas:**

**LOT** Número de lote

**REF** Número de catálogo

 Fecha de caducidad

 Temperatura de conservación

 Léanse las instrucciones de uso

**IVD** Para diagnóstico *in vitro*

 Fabricante

 Número de análisis

#### **Materiales necesarios no suministrados**

- Pipetas con capacidad de 5  $\mu\text{l}$  a 1000  $\mu\text{l}$
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Agua desionizada o destilada
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lavador automático de microplacas con capacidad de 200  $\mu\text{l}$

#### **RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS**

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

#### **PROCEDIMIENTO**

##### **Advertencias preliminares**

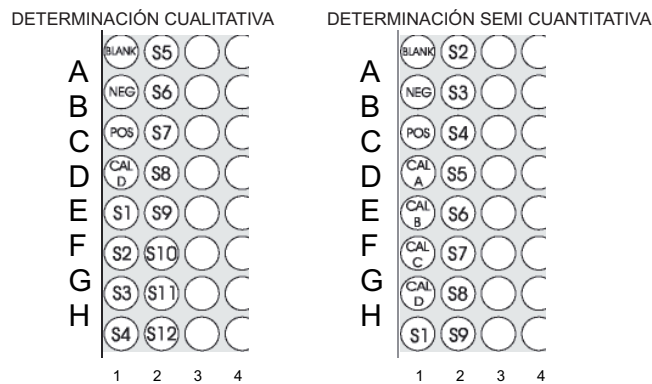
- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente (20-26°C) por 30 minutos. Vuelva a poner los materiales en la nevera inmediatamente después de su uso.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- **Guarde inmediatamente en el sobre con sustancias desecantes las tiras que no utilice; ciérrelo herméticamente para reducir al mínimo la exposición al vapor de agua.**

ES

- Fase de lavado: la buena técnica es crucial. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos..

### Procedimiento del ensayo

1. **LOS REACTIVOS DEBEN ESTAR A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) ANTES DE DAR COMIENZO AL ENSAYO.**
2. Señale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio efectuar los ensayos de muestras por duplicado.
3. **Determinación cualitativa:** use únicamente el Calibrador D. **Determinación semi cuantitativa:** use los Calibradores A - D como se muestra en el ejemplo siguiente.



4. Prepare una dilución de **1:51** de la muestra del paciente, mezclando **10 µl** de la muestra del paciente con **0,5 ml** de diluyente de suero.
5. Añada **100 µl** de calibradores, controles positivo y negativo y muestras diluidas del paciente en los respectivos pocillos como se indica en la hoja de protocolo.  
**Nota:** Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo. La absorbancia de este pocillo no debe ser superior a 0,3.
6. Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  minutos) a temperatura ambiente sobre una superficie plana.
7. Fase de lavado: aspire totalmente el contenido de cada pocillo. Añada 200-300µl de tampón de lavado reconstituido en todos los pocillos y aspire. Repita el procedimiento tres veces más hasta completar cuatro lavados. Después del último lavado, invierta la placa y sacúdala sobre material absorbente para eliminar todo residuo de líquido. No seque completamente los pocillos.
8. Añada 100 µl de conjugado en cada pocillo.
9. Incube los pocillos durante **30 minutos**.
10. Fase de lavado: repita el punto 7.
11. Añada 100µl de substrato enzimático a cada pocillo II.
12. Incube 30 minutos a temperatura ambiente.
13. Añada 100µl de solución Stop a cada pocillo. Mantenga la misma secuencia y tiempos de solución Stop utilizados para el substrato enzimático. Lea la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405nm en el plazo de una hora después de haber detenido la reacción.
14. Lea la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405nm mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble comparándolo con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

### Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser  $<0,3$ . La lectura de absorbancia del calibrador A debe ser  $>1,0$ ; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser  $<20$  EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de ambas lecturas para determinar la concentración de anticuerpos anti-hu tTG. Cuando se efectúan determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial. En caso de muestras de resultado incierto (borderline), aconsejamos repetir el análisis con una muestra nueva tomada en fecha posterior para garantizar la precisión.

## RESULTADOS

### Cálculo

Las concentraciones en la muestra del paciente se pueden determinar mediante dos métodos:

#### 1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

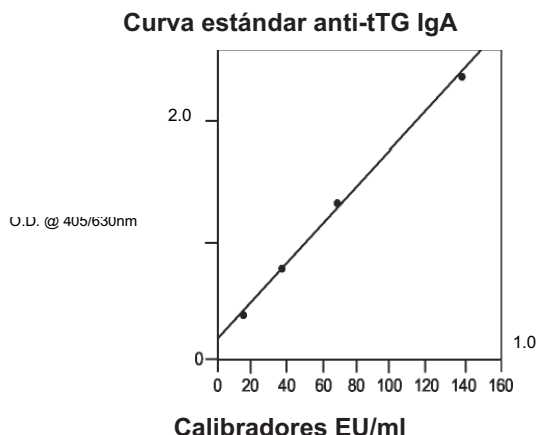
##### Abs. de muestra analizada

\_\_\_\_\_ X EU/ml de Calibrador D= EU/ml muestra analizada

##### Abs. de Calibrador D

#### 2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los Calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en EU/ml en el eje X en relación a la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.



### Calibrador

Los calibradores proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del Calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

### Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales.

Valor Anti-tTG	Interpretación
<20 EU/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Invierto (valores límite)
>25 EU/ml	Pos (+)

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo anti tTG IgA Immulisa™ no debe efectuarse en muestras muy hemolizadas, contaminadas por microbios o lipémicas. Este método debe utilizarse únicamente para analizar muestras de suero humano. Los resultados obtenidos son una herramienta más de diagnóstico y no deben interpretarse como un diagnóstico por sí solos. En pacientes celíacos con deficiencia de IgA, el análisis anti-tTG podría dar resultado negativo.

### VALORES ESPERADOS

Los valores esperados en una población normal son negativos (<20 EU/ml en adultos y niños). Sin embargo, algunos individuos aparentemente sanos y asintomáticos pueden resultar positivos al ensayo de anticuerpos anti-tTG IgA.

Muchos investigadores han estudiado la incidencia de anticuerpos anti-tTG; sus conclusiones se resumen en la tabla 1 de la página 42.

La incidencia y niveles de anticuerpos anti-tTG dependen de la dieta; en efecto, disminuyen y hasta resultan negativos en pacientes con EC sometidos a dieta sin gluten. Del mismo modo, el nivel de estos anticuerpos aumentará, o el análisis anti-tTG resultará positivo en pacientes con EC sometidos a dieta sin gluten que ingieran alimentos con gluten<sup>9,10</sup>.

### CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

La utilidad del ensayo ELISA para detección de anticuerpos anti tTg IgA Immulisa™ se determinó comparando los resultados con:

- otro método ELISA para anticuerpos anti-tTG IgA, y con
- el método Immuglo™ para detección de anticuerpos antiendomisiales por inmunofluorescencia.

Niveles normales: se determinaron analizando un total de 213 muestras, de las cuales 64 eran de donantes de sangre normales y 149, procedentes de un laboratorio de referencia, negativas al análisis de anticuerpos antiendomisiales. De las 213 muestras analizadas para anticuerpos anti tTG, sólo 3 resultaron positivas; la especificidad del ensayo resultó del 99%.

### Especificidad y sensibilidad comparadas

A. Anticuerpos endomisiales vs. ELISA anticuerpos tTG IgA Immulisa™: se analizaron 244 muestras mediante el kit Immuglo™ para detección de anticuerpos antiendomisiales; los resultados se compararon con el ensayo ELISA anticuerpos tTG IgA Immulisa™. Los resultados se resumen a continuación:

		Immco™ anti-tTg IgA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Immco™ EMA	POS (+)	86	9	95
	NEG (-)	1	148	149
	TOT (=)	87	157	244

Especificidad relativa: 96%

Sensibilidad relativa: 91%

Correspondencia relativa: 99%

ES

B. ELISA anticuerpos tTG IgA ImmuLISA™ vs. otro método ELISA anti-tTG IgA disponible en comercio: con estos dos kits se analizó un total de 137 muestras. Los resultados fueron los siguientes:

		<b>Immco™ anti-tTg IgA</b>		
		<b>POS (+)</b>	<b>NEG (-)</b>	<b>TOT (=)</b>
<b>Otro</b>	<b>POS (+)</b>	77	5	82
<b>ELISA</b>	<b>NEG (-)</b>	1	54	55
	<b>TOT (=)</b>	78	59	137

especificidad relativa: 95%

sensibilidad relativa: 91%

correspondencia relativa: 98%

C. Reactividad cruzada: un total de 30 muestras, de las cuales 10 positivas a anticuerpos antinucleares, 10 a anticuerpos anti zona membrana basal y 10 a anticuerpos anti intercelular, se analizaron para anticuerpos anti-tTG IgA y ninguna de ellas resultó positiva.

#### **Precisión:**

Se analizaron en 10 repeticiones muestras con concentraciones conocidas de anticuerpos anti-tTG IgA, en 10 repeticiones y a lo largo de dos semanas. El coeficiente de variación (CV) intra ensayo e inter ensayo es el siguiente:

<b>Anti-tTG IgA</b>	<b>Intra-placa CV</b>	<b>Inter-placa CV</b>
1. 186 EU/ml	5.3%	4.9%
2. 118 EU/ml	2.3%	4.9%
3. 51 EU/ml	9.2%	7.4%

#### **Recuperación**

Muestras con concentraciones conocidas de anticuerpos anti tTG IgG se mezclaron con diluciones apropiadas de otra muestra positiva con cantidades conocidas de esos mismos anticuerpos. Se determinaron los niveles de anticuerpos anti-tTG IgA de las muestras mezcladas y a partir de los valores obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación. Los resultados fueron los siguientes:

	<b>EU/ml añadida</b>	<b>EU/ml obtenida</b>	<b>% Recuperación</b>
1.	151	162	107%
2.	126	140	111%



## IgA-Anti-Gewebstransglutaminase-Antikörper-ELISA (tTg)

IVD

### BEIPACKTEXT

REF 1157 IgA-tTG-ELISA 96 Bestimmungen

### VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von IgA-Antikörpern gegen Gewebstransglutaminase in Humanserum als Hilfsmittel bei der Diagnose von Zöliakie.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Zöliakie (Celiac Disease - CD) ist eine chronische Erkrankung des Verdauungstrakts, die durch eine Autoimmunreaktion gegen Gluten, ein in Weizen vorkommendes Eiweiß, verursacht wird. Sie ist durch die Schädigung der absorbierenden Zotten und Hyperplasien der Krypten im Dünndarm gekennzeichnet. Zu den Symptomen zählen Durchfall, Gewichtsverlust und Anämie aufgrund einer Malabsorption von Eisen und Folsäure. Aktive CD erhöht das Risiko von bösartigen Tumoren im Gastrointestinaltrakt<sup>1</sup>, Infertilität<sup>2</sup>, Osteoporose<sup>3</sup> sowie Epilepsie und anderen neurologischen Syndromen<sup>4</sup>. Zöliakie wird mit einer glutenfreien Diät behandelt.

CD ist in der weißen europäischen Bevölkerung weit verbreitet. Da die Krankheit genetisch bedingt ist und die europäischen und amerikanischen weißen Bevölkerungen gemeinsame Vorfahren haben, wird angenommen, dass die tatsächliche Häufigkeit von CD in den Vereinigten Staaten höher ist als in der Vergangenheit berichtet. Serologische Tests wurden als Hilfsmittel für die Diagnose von CD entwickelt (z.B. IF-Tests für Anti-Endomysium-Antikörper (EMA) und Anti-Retikulin-Antikörper, ELISA für Anti-Gliadin-Antikörper). Kürzlich identifizierten Dietrich et al<sup>5</sup> ein mit EMA verbundenes Antigen als Gewebstransglutaminase (tTg). Dies ermöglichte es, einen ELISA-Test für EMA zu entwickeln, der weniger subjektiv als die üblichen Immunfluoreszenzmethoden ist.

Transglutaminasen (EC 2.3.2.13) sind eine vielgestaltige Familie von Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Enzymen mit unterschiedlichen Genen, Strukturen und biologischen Funktionen<sup>6</sup>. Diese Enzyme sind allgegenwärtig und über die Arten hinweg gut erhalten<sup>7</sup>. Von allen humanen Transglutaminasen ist tTg die am weitesten verbreitete. Obwohl sie primär ein intrazelluläres Enzym ist, kann tTg aus den Zellen abgesondert werden und sammelt sich in der extrazellulären Matrix an<sup>8</sup>. tTg spielt möglicherweise eine Rolle bei der Stabilisierung der extrazellulären Matrix, indem es als hochwirksamer biologischer Klebstoff dient. Autoantikörper gegen tTg können dessen normales Funktionieren unterbrechen oder beeinträchtigen, was zu den bei CD zu beobachtenden histologischen und pathologischen Veränderungen führt. tTg ist ein wichtiger Analyt für die Diagnose von CD<sup>5,9,10,11</sup>.

### TESTPRINZIP

Gewebstransglutaminase-Antigen wird an die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte aus Polystyrol gebunden. Anschließend werden die unreaktierten Stellen blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibratoren und verdünnte Patientenserum werden in separate Vertiefungen gegeben; dies ermöglicht die Bindung der eventuell vorhandenen Anti-tTg-Antikörper an das immobilisierte Antigen. Ungebundene Proben werden durch Waschen entfernt, und jeder Vertiefung wird ein enzymmarkiertes Anti-human-IgA-Konjugat hinzugefügt. Diese enzymkonjugierten Antikörper binden sich spezifisch an das menschliche Immunglobulin der Klasse IgA. Nachdem eventuell nicht gebundenes Konjugat durch Waschen entfernt wurde, wird den Vertiefungen ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) hinzugefügt. Nachdem die enzymatische Reaktion gestoppt wurde, wird die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) angegeben.

## REAGENZIEN

### Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.** Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

### Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis<sup>12</sup>.

WARNUNG – Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

**Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen.** Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer.

Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um die mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten.

Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

### Mitgelieferte Materialien

Immulin<sup>TM</sup> IgA-tTG-ELISA **REF** 1157

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen.



12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>tTG</b>	<b>Mikrotiterplatte</b> mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit tTG-Antigen beschichtet.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR A</b>   <b>tTG</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator A</b> ( <i>grüne Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR B</b>   <b>tTG</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator B</b> ( <i>lila Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR C</b>   <b>tTG</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator C</b> ( <i>blaue Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR D</b>   <b>tTG</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator D</b> ( <i>gelbe Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL +</b>   <b>tTG</b> *	Gebrauchsfertiges <b>positives Kontrollserum</b> ( <i>rote Kappe</i> ). Enthält tTG-positives Humanserum.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Gebrauchsfertiges <b>negatives Kontrollserum</b> ( <i>weiße Kappe</i> ). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	<b>IgA-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	Gebrauchsfertiges <b>Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat</b> . Farbkennzeichnung rosa.

DE

1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Serumverdünner</b> . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Gebrauchsfertiges <b>Enzymsubstrat</b> . Enthält pNPP. <b>Vor Licht schützen</b> .
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Gebrauchsfertige <b>Stopplösung</b> .
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Waschpuffer in Pulverform</b> . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

\* Enthält < 0.1% NaN<sub>3</sub>

#### Auf den Etiketten verwendete Symbole:

-  Chargennummer
-  Bestellnummer
-  Verwendbar bis
-  Lagerungstemperatur
-  Gebrauchsanleitung lesen
-  In-vitro-Diagnostikum
-  Hersteller
-  Anzahl an Tests

#### Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

#### PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

#### VERFAHREN

##### Hinweise zum Verfahren

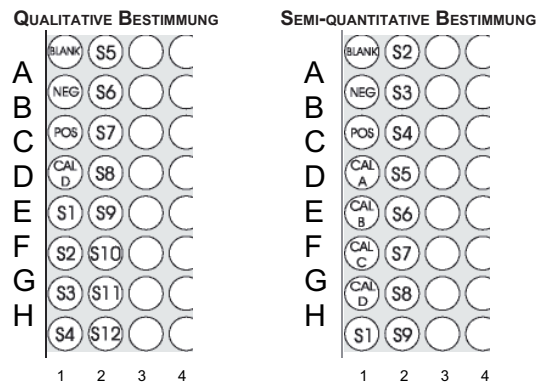
- Lesen Sie sorgfältig diese Anweisungen, bevor Sie mit dem Test beginnen.

DE

- Bringen Sie alle Reagenzien und Proben 30 Minuten lang auf Raumtemperatur (20-26 °C). Stellen Sie die Materialien sofort nach ihrer Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Bereiten Sie alle Verdünnungen der Patientenproben vor Beginn des Tests vor.
- **Geben Sie nicht verwendete Streifen sofort wieder in den Beutel mit dem Trockenmittel und verschließen Sie diesen fest, um den Kontakt mit Wasserdampf so gering wie möglich zu halten.**
- Waschschritt: Eine gute Methode ist unerlässlich. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen verteilen kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Eine sorgfältige zeitliche Koordinierung ist wichtig. Die Inkubationszeiträume beginnen nach der Verteilung der Reagenzien.

### Testverfahren

1. **ALLE REAGENZIEN MÜSSEN VOR BEGINN DES TESTS AUF RAUMTEMPERATUR (20-26 °C) GEBRACHT WERDEN.**
2. Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in der Mikrotiterplatte zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.
3. **Qualitative Bestimmung:** Verwenden Sie nur Kalibrator D.  
**Semi-quantitative Bestimmung:** Verwenden Sie Kalibratoren A-D wie im untenstehenden Beispiel gezeigt.



4. Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:51**, indem Sie **10 µl** der Patientenprobe mit **0,5 ml** Probenverdünner vermischen.
5. Geben Sie **100 µl** der Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.  
**Anmerkung:** Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null. Die Extinktion dieser Vertiefung sollte nicht über 0,3 liegen.
6. Inkubieren Sie **30 Minuten** ( $\pm$  5 Minuten) lang bei Raumtemperatur auf einer ebenen Oberfläche.
7. Waschschritt: Saugen Sie den Inhalt jeder Vertiefung gründlich aus. Geben Sie 200-300 µL des **rekonstituierten** Waschpuffers in alle Vertiefungen und saugen Sie ihn anschließend ab. Wiederholen Sie diese Schritte noch dreimal, bis Sie insgesamt viermal gewaschen haben. Drehen Sie die Platte um und klopfen Sie sie über saugfähigem Material ab, um jegliche nach dem letzten Waschen verbliebene Flüssigkeit zu entfernen. Trocknen Sie die Vertiefungen nicht vollständig.
8. Geben Sie 100 µL Konjugat in jede Vertiefung.
9. Inkubieren Sie die Vertiefungen 30 Minuten lang.
10. Waschschritt: Wiederholen Sie Schritt 7.

DE

11. Geben Sie 100 µL Enzymsubstrat in jede Vertiefung.
12. Inkubieren Sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
13. Geben Sie 100 µL Stopplösung in jede Vertiefung. Bewahren Sie bei der Zugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Geschwindigkeit bei, die Sie für das Enzymsubstrat verwendet haben. Lesen Sie die Extinktion (OD) jeder Vertiefung innerhalb einer Stunde nach Zufügen der Stopplösung bei 405 nm ab.
14. Lesen Sie die Extinktion (OD) jeder Vertiefung bei 405 nm mit einem Mikrotiterplattenreader mit einer oder zwei Wellenlängen gegen die auf Null-Extinktion eingestellte Blindprobe ab.

### Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte <0,3 sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von >1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, verwenden Sie den Mittelwert der beiden Messungen, um die Konzentration der Anti-hu-tTg-Antikörper zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen. Wir empfehlen, Proben mit Werten im Grenzbereich mit einer frischen, zu einem späteren Zeitpunkt abgenommenen Probe erneut zu testen, um die Genauigkeit zu gewährleisten.

### ERGEBNISSE

#### Berechnungen

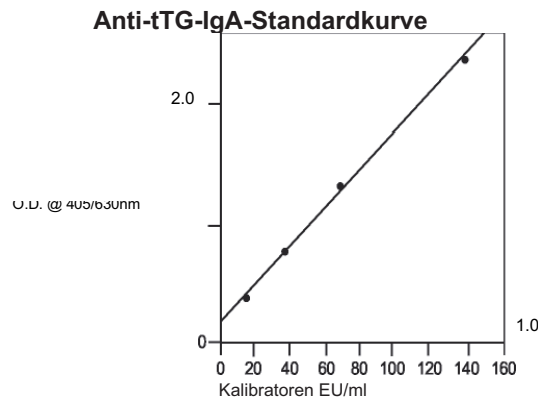
Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

#### 1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

$$\frac{\text{Ext. der Testprobe}}{\text{Ext. von Kalibrator D}} \times \text{EU/ml von Kalibrator D} = \text{EU/ml der Testprobe}$$

#### 2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.



#### Kalibrator

Die Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte

DE

aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte bestimmen zu können, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie die erhaltenen Einheiten mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

### Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborergebnisse. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen.

<b>Anti-tTG-Wert</b>	<b>Interpretation</b>
<20 EU/ml	Neg (-)
20-25 EU/ml	Grenzbereich
>25 EU/ml	Pos (+)

### EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Der ImmuLisa™ IgA-Anti-tTG-Test sollte nicht an stark hämolysierten, mikrobiell verunreinigten oder lipämischen Proben durchgeführt werden. Diese Methode sollte nur verwendet werden, um menschliche Serumproben zu testen. Die erhaltenen Ergebnisse dienen nur als Hilfsmittel bei der Diagnose und sollten nicht allein als diagnostisch gedeutet werden. Bei CD-Patienten mit IgA-Mangel, kann der Anti-tTG-Test negativ sein.

### ERWARTETE WERTE

Der erwartete Wert in einer normalen Bevölkerung ist negativ (<20 EU/ml bei Erwachsenen und Kindern). Es wurde jedoch festgestellt, dass bei einigen anscheinend gesunden Personen ohne Symptome der Test auf IgA-Anti-tTG-Antikörper positiv ausfällt.

Die Häufigkeit von Anti-tTG-Antikörpern wurde von verschiedenen Forschern untersucht; die Ergebnisse sind in Tabelle 1 auf Seite 42 zusammengefasst.

Die Häufigkeit und der Spiegel von Anti-tTG-Antikörpern hängt von der Ernährung ab. In CD-Patienten, die sich glutenfrei ernähren, fallen die Spiegel dieser Antikörper ab und werden schließlich negativ. Andererseits erhöhen sich die Spiegel dieser Antikörper oder die Anti-tTG-Antikörper werden positiv, wenn CD-Patienten, die sich bisher glutenfrei ernährt haben, glutenhaltige Nahrung aufnehmen<sup>9,10</sup>.

### LEISTUNGSMERKMALE

Der Nutzwert des ImmuLisa™ IgA-Anti-tTG-Antikörper-ELISA wurde durch den Vergleich der Ergebnisse mit folgenden Methoden bestimmt:

- a) einer anderen im Handel erhältlichen IgA-Anti-tG-ELISA-Methode und
- b) der ImmuGlo™ Anti-endomysiale-Antikörper-Immunfluoreszenzmethode.

Normaler Bereich: Es wurden insgesamt 213 Proben getestet. Von diesen stammten 64 von normalen Blutspendern, und 149 von einem Referenzlabor erhaltene Proben zeigten negative Ergebnisse beim Test auf endomysiale Antikörper. Von den 213 auf Antikörper gegen tTg getesteten Proben waren nur 3 positiv, was für den Test eine Spezifität von 99% darstellt.

### Vergleichende Spezifität und Sensitivität

A. Endomysiale Antikörper gegen ImmuLisa™ IgA-tTG-Antikörper-ELISA: Insgesamt 244 Proben wurden mit dem ImmuGlo™ Anti-endomysiale-Antikörper-Kit auf endomysiale Antikörper getestet, und die Ergebnisse der anti-endomysialen Antikörper wurden mit der ImmuLisa™ IgA-Anti-tTG-Antikörper-ELISA-Methode verglichen. Die Ergebnisse sind untenstehend zusammengefasst:

DE

		<b>Immco™ IgA-Anti-tTg</b>		
		<b>POS (+)</b>	<b>NEG (-)</b>	<b>GESAMT(=)</b>
<b>Immco™ EMA</b>	<b>POS (+)</b>	86	9	95
	<b>NEG (-)</b>	1	148	149
	<b>GESAMT (=)</b>	87	157	244

relative Spezifität: 96%  
relative Sensitivität: 91%  
relative Übereinstimmung: 99%

B. Immulisa™ Anti-tTG-ELISA gegen eine andere im Handel erhältliche IgA-Anti-tTg-ELISA-Methode: Insgesamt 137 Proben wurden mit dem Immulisa™ IgA-Anti-tTG-Antikörper-Kit und einem anderen im Handel erhältlichen IgA-Anti-tTG-Kit getestet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

		<b>Immco™ IgA-Anti-tTg</b>		
		<b>POS (+)</b>	<b>NEG (-)</b>	<b>GESAMT(=)</b>
<b>Anderer ELISA</b>	<b>POS (+)</b>	77	5	82
	<b>NEG (-)</b>	1	54	55
	<b>GESAMT (=)</b>	78	59	137

relative Spezifität: 95%  
relative Sensitivität: 91%  
relative Übereinstimmung: 98%

C. Kreuzreaktivität: Insgesamt 30 Proben, davon je 10 positiv für antinukleäre Antikörper, Anti-Basalmembran-Antikörper (BMZ) und Anti-interzelluläre-Antikörper (IC), wurden auf IgA-Anti-tTg-Antikörper getestet. Keine der Proben zeigte ein positives Ergebnis.

#### **Genauigkeit:**

Proben mit bekannten IgA-Anti-tTg-Konzentrationen wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen hinweg zehnmal getestet. Die intraserialen und interserialen Variationskoeffizienten (VK) waren wie folgt:

<b>IgA-Anti-tTG</b>	<b>Intraserialer VK</b>	<b>Interserialer VK</b>
1. 186 EU/ml	5,3%	4,9%
2. 118 EU/ml	2,3%	4,9%
3. 51 EU/ml	9,2%	7,4%

#### **Wiederfindung**

Proben mit bekannten IgA-Anti-tTG-Konzentrationen wurden mit geeigneten Verdünnungen einer anderen positiven Probe mit einer bekannten Menge an IgA-Anti-tTG gemischt. Die IgA-Anti-tTg-Antikörperspiegel der gemischten Proben wurden bestimmt und die Wiederfindung in Prozent wurde aus den erhaltenen Werten errechnet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

	<b>EU/ml zugefügt</b>	<b>EU/ml gemessen</b>	<b>% Wiederfindung</b>
1.	151	162	107%
2.	126	140	111%



## Anticorps anti-transglutaminase tissulaire (tTG) IgA ELISA

IVD

### ENCART DU PRODUIT

REF 1157 IgA-tTG ELISA 96 Tests

### UTILISATION PRÉVUE

Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection et la semi-quantification des anticorps IgA anti-Tissus Transglutaminase dans le sérum humain comme aide pour le diagnostic de la maladie coéliquaue.

### RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La maladie cœliquaue (CD) est une maladie digestive chronique causée par une réaction autoimmune contre le gluten, une protéine qui se trouve dans le blé. Elle se caractérise par des dommages occasionnés aux villosités absorbatives et par une hyperplasie des cryptes de l'intestin grêle. Les symptômes comprennent la diarrhée, une perte de poids et une anémie provoquée par une mauvaise absorption du fer et de l'acide folique. Une maladie cœliquaue active augmente les risques de malignité gastrointestinale<sup>1</sup>, de stérilité<sup>2</sup>, d'ostéoporose et d'épilepsie et d'autres syndromes neurologique<sup>4</sup>. La maladie cœliquaue est traitée par un régime exempt de gluten.

La maladie est fréquente au sein de la population caucasienne européenne. Dans la mesure où la maladie est transmise génétiquement et que la population caucasienne européenne et américaine possède une ascendance commune, on présume que la prévalence actuelle de la maladie cœliquaue aux États-Unis est supérieure à celle qui a été notée par le passé. Des tests sérologiques ont été développés afin de soutenir le dans diagnostic de la maladie cœliquaue (à savoir la méthode ELIA par anticorps anti-endomysial (EMA), anticorps anti-réticuline IFA and anticorps anti-gliadine). Récemment, Dietrich et al5 ont d identifié l'antigène associé avec l'antigène anti-endomysial comme étant la transglutaminase tissulaire (tTG). Cela a rendu possible la création d'un test de type ELISA pour les anticorps anti-endomysial qui serait moins subjectif que les méthodes par immunofluorescence habituelles.

La transglutaminase (EC 2.3.2.13) est une famille différente d'enzymes dépendant du Ca<sup>+2</sup> présentant des gènes, des structures et des fonctions biologiques distinctes<sup>6</sup>. Ces enzymes sont omniprésentes et hautement conservées à travers les espèces<sup>7</sup>. De toutes les transglutaminases humaines, la tTG (transglutaminase tissulaire) est la plus répandue. Bien qu'étant à l'origine une enzyme intracellulaire, la tTG peut être sécrétée par des cellules et peut être accumulée dans la matrice extracellulaire<sup>8</sup>. La tTG peut jouer un rôle dans la stabilisation de la matrice extracellulaire, en fonctionnant comme une colle biologique extrêmement efficace. Les auto-anticorps contre la tTG peuvent interrompre ou perturber son bon fonctionnement, en se traduisant par des altérations histologiques et pathologiques qui apparaissent dans la maladie cœliquaue. Le tTG est une substance d'analyse importante pour le diagnostic de la maladie cœliquaue <sup>5,9,10,11</sup>.

### PRINCIPES DE LA MÉTHODE

L'antigène transglutaminase tissulaire est lié aux puits d'une plaquette de puits en polystyrène, suivi par un blocage des sites sans réaction afin de limiter l'agglutination non spécifique. Les régulateurs, les calibreurs et le sérum dilué du patient sont ajoutés aux puits séparés, en permettant aux anticorps anti-tTG présents de se lier à l'antigène immobilisé. L'échantillon non lié est éliminé par lavage et un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique IgA humain est ajouté à chaque puits. Ces anticorps conjugués à une enzyme se lient de manière spécifique à l'immunoglobuline humaine de la classe IgA. Après élimination par lavage de tout le conjugué non lié, le substrat spécifique de la phosphatase alcaline (pNPP - paranitrophénylphosphate) est alors ajouté aux puits. La réaction enzymatique est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA par millilitre (EU)/ml.

## RÉACTIFS

### Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8°C. **Ne pas congeler.** Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant l'usage. Quand elle est entreposée à 2-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration du kit. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée. Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

### Précautions

Destiné à un usage diagnostique in vitro. Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux<sup>12</sup>.

**AVERTISSEMENT** – L'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

**Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables.** Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue d'Immco Diagnostics Inc.

Il faut avoir recours à de bonnes techniques de laboratoire pour minimiser la contamination microbienne et chimique. Ne pas utiliser après l'expiration de la date de péremption.

### Matériel fourni

Immulin™ IgA-tTG ELISA **REF** 1157

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.









12 x 8	<b>MICROPLATE tTG</b>	<b>Micro-lamelle</b> avec micropuits individuels, revêtus d'antigène tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR A tTG</b> *	<b>Calibreur A</b> ( <i>couvercle vert</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR B tTG</b> *	<b>Calibreur B</b> ( <i>couvercle violet</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR C tTG</b> *	<b>Calibreur C</b> ( <i>couvercle bleu</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR D tTG</b> *	<b>Calibreur D</b> ( <i>couvercle jaune</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL + tTG</b> *	<b>Régulateur positif</b> ( <i>couvercle rouge</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Régulateur négatif</b> ( <i>couvercle blanc</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	<b>IgA-CONJ ALKPHOS</b> *	<b>Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines.</b> Code couleur rose.

FR

1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. <b>Protéger de la lumière.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Solution d'arrêt prête à l'emploi.
2 x	<b>BUF WASH</b>	Tampon de lavage en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

\* Contient < 0.1% NaN<sub>3</sub>

#### Symboles utilisés sur les étiquettes:

	Numéro de lot
	Numéro de référence catalogue
	A utiliser avant
	Température de conservation
	Lire les instructions d'utilisation
	Pour usage diagnostique In vitro
	Fabricant
	Nombre de tests

#### Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes de test
- Eau distillée ou désionisée
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Nettoyeur automatique de microplaque en mesure de dispenser 200 µl

#### RÉCOLTE DES SPÉCIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

#### PROCÉDURE

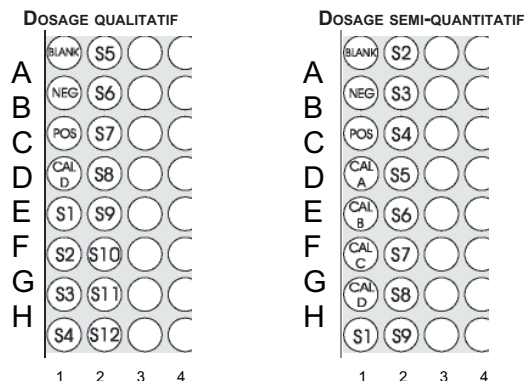
##### Notes de procédure

- Avant de commencer l'essai, il faut lire les présentes instructions avec soin.
- Amener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (20-26°C) pendant 30 minutes. Remettre le sachet dans le réfrigérateur immédiatement après son utilisation.

- Préparer toutes les dilutions des échantillons de patient avant de commencer le test.
- **Remettre immédiatement les bandes inutilisées dans le sachet contenant des produits dessiccatifs et sceller avec soin pour limiter le plus possible l'exposition à la vapeur d'eau.**
- Étape du lavage : Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- Un chronométrage soigneux est important. Les périodes d'incubation commencent après avoir dispensé les réactifs.

### Procédure d'essai

1. **TOUS LES RÉACTIFS DOIVENT ÊTRE AMENÉS À TEMPÉRATURE AMBIANTE (20-26°C) AVANT USAGE.**
2. Étiqueter le feuillet du protocole pour indiquer l'emplacement du spécimen dans la microplaque. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.
3. **Dosage qualitatif** : utiliser seulement le calibreur D. **Dosage semi-quantitatif** Utiliser les calibreurs A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.



4. Préparer une dilution **1:51** d'échantillon de patient en mélangeant **10 µl** d'échantillon de patient **0.5 ml** de diluant de sérum.
5. Ajouter **100 µl** de calibreurs, de régulateurs positif et négatif et d'échantillons de patient dilués dans les micropuits appropriés indiqués dans le dossier du protocole. 3  
**Note** : Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif à blanc. Mettre le lecteur ELISA à zéro par rapport au réactif à blanc. L'absorption de ce puits ne doit pas être supérieure à 0,3.
6. Incuber **30 minutes** ( $\pm$  5 minutes) à température ambiante sur une surface plane.
7. Étape du lavage : Aspirer soigneusement le contenu de chaque puits. Ajouter 200-300µL de la solution de lavage *reconstituée* aux puits et, ensuite, aspirer. Répéter cette séquence trois fois pour un total de quatre lavages. Renverser la plaque et la tapoter sur un matériau absorbant pour enlever tout le fluide résiduel après le dernier lavage. Ne pas sécher complètement les puits.
8. Ajouter 1 00µL de conjugué à chaque puits.
9. Faire incuber les puits pendant 30 minutes.
10. Étape du lavage : Recommencer l'étape 7.
11. Ajouter 1 00µL de substrat d'enzyme à chaque puits.

FR

12. Incuber pendant 30 minutes ( $\pm$  5 min) à température ambiante.
13. Ajouter 1 00 $\mu$ L de solution d'arrêt à chaque puits. Maintenir la même séquence et chronométrage pour l'addition de la solution d'arrêt que celle qui fut utilisée pour le substrat d'enzyme. Lire l'absorption (OD) de chacun des puits à 405nm dans l'heure qui suit la réaction.
14. Lire l'absorption (OD) de chaque puits à 405nm, en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde (405/630nm) par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

### Contrôle de qualité

Des calibres, des régulateurs positif et négatif et un réactif à blanc doivent être utilisés à chaque essai pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif à blanc doit être inférieure à 0,3. Le calibre A doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1 sans quoi le test doit être recommencé. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est effectué en double, il faut prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer la concentration d'anticorps anti-transglutaminase tissulaire humaine. Quand on procède à des dosages qualitatifs, la densité optique du calibre D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs dans la plage figurant sur la fiole. Nous conseillons de tester les échantillons limites avec un échantillon frais pris à une date plus tardive pour garantir l'exactitude.

### RÉSULTATS

#### Calculs

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

#### 1. DOSAGE QUALITATIF

Abs. de l'échantillon d'essai

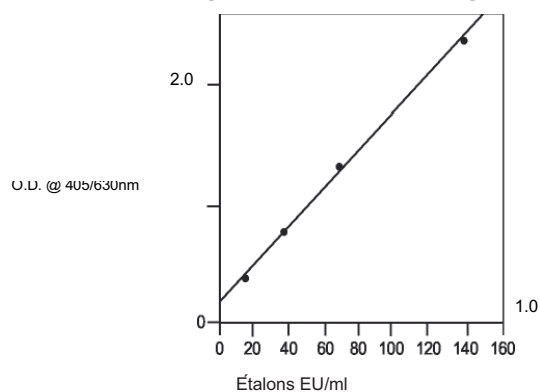
----- X EU/ml de Calibre D = EU/ml Échantillon de test

Abs. de calibre D

#### 2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption du Calibre A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en EU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe meilleure. Déterminer les concentrations des échantillons de patient de la courbe par rapport à sa valeur d'absorption correspondante.

Anti-tTG IgA Courbe D'étalonnage



### Calibreur

Les calibreurs prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patients qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux du calibreur A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent être encore dilués de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe du calibreur quand on refait l'essai. Pour la détermination EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

### Interprétation

Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Anti-tTG Valeur	Interprétation
<20 EU/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Indéterminé
>25 EU/ml	POS (+)

### LIMITES DE LA PROCÉDURE

Le test Immulisa™ anti-tTG IgA ne devrait pas être exécuté sur des échantillons grossièrement hémolysés, contaminés du point de vue microbien ou lipémiques. Cette méthode doit uniquement être utilisée pour le test d'échantillons de sérum humain. Les résultats obtenus servent seulement comme aide dans le diagnostic et ne doivent pas être interprétés comme un diagnostic par eux-mêmes. Chez les patients souffrant de maladie cœliaque avec déficience en IgA, les anticorps anti-tTG peuvent être négatifs.

### VALEURS ATTENDUES

Les valeurs attendues dans une population normale sont négatives (< 20 EU/ml pour les adultes et les enfants). Cependant, on a remarqué que certains individus apparemment sains, asymptomatiques peuvent apparaître positifs pour les anticorps anti-tTG IgA.

L'incidence des anticorps anti-transglutaminase tissulaire a été étudiée par plusieurs chercheurs et les conclusions sont résumées dans le Tableau 1 du présent document.

L'incidence et les niveaux des anticorps anti-tTG dépendent de l'état de l'alimentation. Les niveaux de ces anticorps diminuent et deviendront finalement négatif chez les malades avec maladie cœliaque qui suivent un régime exempt de gluten. De la même façon, les niveaux de ces anticorps augmenteront et les anticorps anti-tTG peuvent devenir positifs quand les malades atteints de maladie cœliaque qui suivaient un régime sans gluten passent à un régime avec gluten<sup>9,10</sup>.

### DONNÉES DE RENDEMENT

L'utilité de la méthode ELISA par anticorps anti-tTG IgA Immulisa™ a été déterminée en comparant les résultats avec :

- une autre méthode anti-tTG IgA ELISA disponible dans le commerce.
- La méthode anticorps anti-endomysial par immunofluorescence ImmuGlo™

Plage normale : Un total de 213 échantillons a été testé. Parmi ceux-ci, 64 étaient des donateurs du sang normaux et 149, obtenus d'un laboratoire de référence, étaient testés négatifs pour les anticorps anti-endomysial. De ces 213 échantillons testés pour les anticorps à la tTG, 3 seulement ont été testés comme positifs, en fournissant une spécificité du test de 99%.

### Spécificité et sensibilité comparatives :

A. Anticorps anti-endomysial contre anticorps tTG ELISA IgA Immulisa™. Un total de 244 échantillons a été testé pour les anticorps anti-endomysium en utilisant un kit anticorps anti-endomysial ImmuGlo™ et les résultats des anticorps anti-endomysial ont été comparés avec la méthode ELISA anti tTG IgA Immulisa™. Les résultats figurent ci-dessous.

FR

		Immco™ anti-tTg IgA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Immco™	POS (+)	86	9	95
EMA	NEG (-)	1	148	149
	TOT (=)	87	157	244

relative specificity: 96%  
relative sensitivity: 91%  
relative agreement: 99%

B. ImmuLisa™ anti-tTG ELISA contre une autre méthode ELISA anti-tTG IgA disponible dans le commerce : Un total de 137 échantillons ont été testés sur le kit ELISA anticorps anti-tTG IgA et d'autres kits anti-tTG IgA disponibles dans le commerce. Les résultats sont les suivants :

		Immco™ anti-tTg IgA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Autre	POS (+)	77	5	82
ELISA	NEG (-)	1	54	55
	TOT (=)	78	59	137

relative specificity: 95%  
relative sensitivity: 91%  
relative agreement: 98%

C. Réactivité croisée : Un total de 30 échantillons, 10 entre eux étant positifs aux anticorps antinucléaires, anti-membrane basale (BMZ) et anti-intercellulaire (IC) ont été testés pour les anticorps anti-tTG IgA. Aucun n'a été trouvé positif.

#### Précision :

Des échantillons avec des concentrations connues d'anti-tTG IgA ont été analysés dans 10 mesures sur une période de deux semaines. Les coefficients de variation Intra - et inter-essai (CV) étaient les suivants :

Anti-tTG IgA	Intra-plaque CV	Inter-plaque CV
1. 186 EU/ml	5,3%	4,9%
2. 118 EU/ml	2,3%	4,9%
3. 51 EU/ml	9,2%	7,4%

#### Récupération :

Des échantillons avec des concentrations connues anti-tTG IgA ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon avec des quantités connues d'anti-tTG IgA. Les niveaux des anticorps anti-tTG IgA des échantillons mélangés ont été déterminés et on a calculé le pourcentage de récupération à partir des valeurs obtenues. Les résultats sont les suivants :

	EU/ml supplémentaire	EU/ml obtenu	% Recovery
1.	151	162	107%
2.	126	140	111%



## Anticorpi Anti-transglutaminasi Tissutale Guinea Pig (tTG) IgA ELISA

IVD

### INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1157 (*Cavia porcellus*) tTG- IgA ELISA 96 Determinazioni

### FINALITÀ D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la ricerca e la semiquantificazione di anticorpi anti-transglutaminasi tissutale *Cavia porcellus* di classe IgA nel siero come strumento utile per la diagnosi della malattia celiaca.

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La malattia celiaca (MC) è un disturbo digestivo cronico, causato da una reazione autoimmune al glutine, una proteina presente nel grano, che provoca danni alle strutture deputate all'assorbimento (villi intestinali) e iperplasia delle cripte dell'intestino tenue. I sintomi includono diarrea, perdita di peso e anemia da malassorbimento di ferro e di acido folico. La MC attiva aumenta il rischio di carcinogenicità gastrointestinale<sup>1</sup>, infertilità<sup>2</sup>, osteoporosi e epilessia e di altre sindromi neurologiche<sup>4</sup>. La malattia celiaca viene trattata con una dieta priva di glutine.

La celiachia è comune nella popolazione caucasica europea. Dato che la malattia ha una mediazione genetica e che le popolazioni caucasiche Europea e Americana condividono una comune discendenza, si sospetta che la reale prevalenza della celiachia negli Stati Uniti sia superiore rispetto a quella riportata in passato. Sono stati sviluppati test sierologici di aiuto nella diagnosi della malattia celiaca (test per gli anticorpi anti-endomisio (EMA), IFA per gli anticorpi anti-reticolina e ELISA per gli anticorpi anti-gliadina). Recentemente, Dietrich et al<sup>5</sup> hanno identificato che l'antigene associato con l'EMA è la transglutaminasi (tTG). Ciò ha reso possibile lo sviluppo di un test ELISA per gli anticorpi EMA che è meno soggettivo dei tipici metodi in immunofluorescenza.

Le transglutaminasi (EC 2.3.2.13) sono una variegata famiglia di enzimi Ca<sup>+2</sup> dipendenti con geni, strutture e funzioni biologiche distinti<sup>6</sup>. Questi enzimi sono molto diffusi e altamente preservati attraverso le specie<sup>7</sup>. Delle transglutaminasi umane, la tTG ha un'ampia distribuzione. Malgrado si tratti primariamente di un enzima intracellulare, la tTG può essere secreta dalle cellule e può accumularsi nella matrice extracellulare<sup>8</sup>. La tTG può ricoprire il ruolo di stabilizzante della matrice extracellulare, agendo da collante biologico altamente efficiente. Gli anticorpi anti-tTG possono distruggere la transglutaminasi o interferire con il suo normale funzionamento, provocando i cambiamenti istologici e patologici caratteristici della MC. La tTG è pertanto un importante analita per la diagnosi della celiachia<sup>5,9,10,11</sup>.

### PRINCIPI DELLE METODICHE

L'antigene tissutale transglutaminasi si lega ai pozzetti di una micropiastra in polistirene, segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito, per ridurre i legami non specifici. Controlli, calibratori e campioni diluiti di siero del paziente vengono aggiunti in pozzetti separati, e ciò permette agli anticorpi anti-tTG presenti nel siero di legarsi all'antigene immobilizzato. Il campione non legato viene lavato via e in ciascun pozzetto viene aggiunto un coniugato anti-IgA umano marcato con enzima. Questi anticorpi coniugati con l'enzima si legano in modo specifico all'immunoglobulina umana di classe IgA. Successivamente alla rimozione mediante lavaggio del coniugato non legato, nei pozzetti viene aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP). La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in unità ELISA (EU/ml).

### REAGENTI

#### Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.** Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Le strisce con i pozzetti sono monouso.

## Precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali<sup>12</sup>.

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN<sub>3</sub>) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

**Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo.** Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo.

Usare tecniche di laboratorio idonee per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

## Materiali forniti

tTG-IgA ELISA ImmuLisa™ **REF** 1157

Il kit contiene reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni

12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>tTG</b>	<b>Micropiastra</b> con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR A</b>   <b>tTG</b> *	<b>Calibratore A</b> (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR B</b>   <b>tTG</b> *	<b>Calibratore B</b> (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR C</b>   <b>tTG</b> *	<b>Calibratore C</b> (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR D</b>   <b>tTG</b> *	<b>Calibratore D</b> (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL +</b>   <b>tTG</b> *	<b>Controllo Positivo</b> (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Controllo Negativo</b> (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	<b>IgA-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	<b>Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgA umano pronto all'uso</b> ; di colore rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente siero</b> pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato Enzimatico pronto all'uso.</b> Contiene pNPP. <b>Proteggere dalla luce.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Soluzione di Stop</b> pronta all'uso.
2 x	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>	<b>Tampone di Lavaggio</b> in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

\* Contiene < 0,1% NaN<sub>3</sub>






## Simboli usati sulle etichette:

**LOT** Numero di lotto

**REF** Numero catalogo

 Scadenza

IT

-  Temperatura di conservazione
-  Leggere le istruzioni per l'uso
-  Uso diagnostico in vitro
-  Produttore
-  Numero di test

#### **Materiali necessari ma non forniti**

- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Timer
- Carta assorbente
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

#### **RACCOLTA DEL CAMPIONE**

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

#### **PROCEDURA**

##### **Note sul test**

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti (20-26°C) per 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i materiali non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- **Riporre immediatamente le strisce inutilizzate nella busta di confezionamento dove sono presenti dissecanti e sigillare per minimizzare l'esposizione a vapore acqueo.**
- Fase di lavaggio: Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e il tempo di incubazione più uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta dei reagenti.

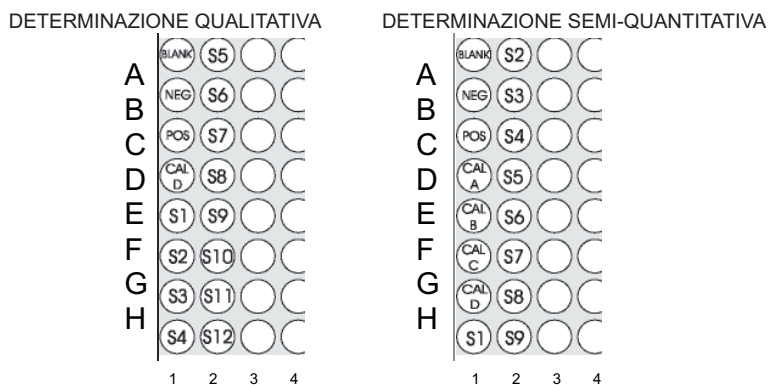
##### **Metodo del test**

1. **TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) PRIMA DELL'INIZIO DEL TEST.**
2. Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nella micropiastra. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.

IT

3. **Determinazione qualitativa:** usare unicamente il Calibratore D.

**Determinazione semiquantitativa:** usare i Calibratori da A a D pronti all'uso, come illustrato nell'esempio di disposizione riportato sotto:



4. Preparare una diluizione **1:51** del campione del paziente mescolando **10 µl** di campione con **0,5 ml** di Diluente del Siero.
5. Aggiungere **100 µl** di Calibratori, di Controlli Positivi e Negativi e di campioni del paziente diluiti nei pozzetti appropriati come indicato sul foglio protocollo. 3
- Nota:** Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco. L'assorbanza del bianco non deve essere superiore a 0,3.
6. Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente su una superficie piana.
7. Fase di lavaggio: Aspirare completamente i contenuti di ciascun pozzetto. Aggiungere 200-300 µL del tampone di lavaggio **ricostituito** in tutti i pozzetti e poi aspirare. Ripetere questa sequenza per altre tre volte per un totale di quattro lavaggi. Invertire la piastra e batterla su materiale assorbente per rimuovere residui di liquido dell'ultimo lavaggio. Non asciugare i pozzetti completamente.
8. Aggiungere 100 µL di Coniugato in ogni pozzetto.
9. Incubare i pozzetti per 30 minuti.
10. Fase di lavaggio: Ripetere la procedura 7.
11. Aggiungere 100 µL di Substrato Enzimatico in ogni pozzetto.
12. Incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
13. Aggiungere 100µL di Soluzione di Stop in ciascun pozzetto. Per l'aggiunta della Soluzione di Stop rispettare lo stesso ordine e gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
14. Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia contro il bianco impostato su assorbanza 0.

### Controllo di Qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere  $<0,3$ . Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore  $<20$  EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, prendere la media delle due letture per determinare la concentrazione degli anticorpi anti-hu tTG. Se si eseguono le determinazioni qualitative, l'assorbanza del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore di quella del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone. Si raccomanda che i campioni borderline vengano testati con un campione fresco prelevato ad una data successiva per assicurare l'accuratezza.

IT

## RISULTATI

### Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

#### 1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

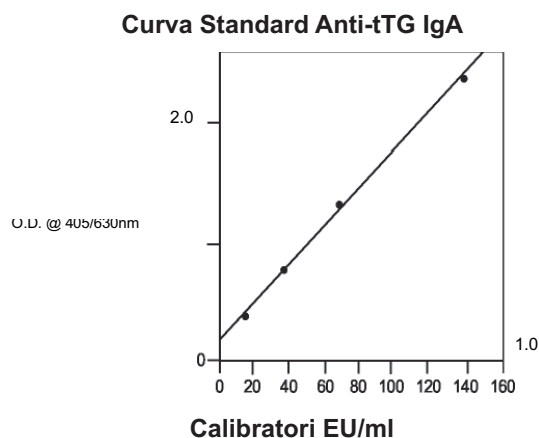
##### Assorbanza del campione del test

----- X EU/ml di Calibratore D = EU/ml del Campione

##### Assorbanza del calibratore D

#### 2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.



### Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

### Interpretazione

Le informazioni che seguono servono unicamente da guida nell'interpretazione dei risultati di laboratorio. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali.

Valore Anti-tTG	Interpretazione
<20 EU/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Borderline
>25 EU/ml	Pos (+)

### LIMITAZIONI DEL TEST

Il Test per gli Anticorpi anti-tTG IgA Immulisa™ non deve essere eseguito su campioni fortemente emolizzati, microbiologicamente contaminati o lipemici. Questa metodica deve essere usata per testare solo campioni di siero umano. I risultati ottenuti rappresentano unicamente un elemento di supporto alla diagnosi, considerati singolarmente non hanno valenza diagnostica. Nei pazienti celiaci con deficit di IgA gli anti-tTG possono essere negativi.

## VALORI ATTESI

I valori attesi in una popolazione normale sono negativi (<20 EU/ml per adulti e bambini). Tuttavia, è stato determinato che alcuni individui apparentemente sani e asintomatici possono risultare positivi agli anticorpi anti-tTG di classe IgA.

L'incidenza degli anticorpi anti-tTG è stata studiata da molti autori e i risultati sono riassunti nella tabella 1 a pagina 42.

L'incidenza e i livelli degli anticorpi anti-tTG dipendono dallo stato della dieta. I livelli di questi anticorpi diminuiscono fino a diventare negativi in pazienti celiaci che si sottopongono a una dieta priva di glutine. Similmente, i livelli di questi anticorpi aumentano o i valori diventano positivi quando i pazienti celiaci in regime di dieta priva di glutine ingeriscono alimenti contenenti glutine<sup>9,10</sup>.

## CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

L'utilità del Test per gli Anticorpi Anti-tTG IgA (ELISA) ImmuLisa™ stata determinata confrontando i risultati con:

- Un altro metodo anti-tTG IgA ELISA disponibile in commercio e
- il metodo in immunofluorescenza per gli anticorpi anti-endomisio ImmuGlo™.

Intervallo normale: Sono stati testati complessivamente 213 campioni. Di questi, 64 provenivano da donatori normali e 149, ottenuti da un laboratorio di riferimento, risultavano negativi agli anticorpi anti-endomisio. Dei 213 campioni analizzati per gli anticorpi anti-tTG, solo 3 erano positivi, fornendo una specificità del 99% per l'analisi.

### Comparabilità, Specificità e Sensibilità

A. Anticorpi anti-endomisio rispetto a Anticorpi tTG IgA ELISA ImmuLisa™: Sono stati analizzati complessivamente 244 campioni per gli anticorpi anti-endomisio usando il kit per gli anticorpi anti-endomisio ImmuGlo™ e i risultati sono stati comparati con il metodo anti-tTG IgA ELISA ImmuLisa™. I risultati ottenuti sono elencati sotto:

		Anti-tTg IgA Immco™		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Immco™	POS (+)	86	9	95
	NEG (-)	1	148	149
	TOT (=)	87	157	244

Specificità: 96%  
Sensibilità: 91%  
Concordanza: 99%

B. Anti-tTG ELISA ImmuLisa™ rispetto a un altro metodo disponibile in commercio anti-tTG IgA ELISA: Sono stati testati complessivamente 137 campioni di siero con il kit per gli anticorpi anti-tTG IgA ImmuLisa™ e con un altro kit anti-tTG IgA disponibile in commercio. I risultati ottenuti sono i seguenti:

		Anti-tTg IgA Immco™		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Altro	POS (+)	77	5	82
	NEG (-)	1	54	55
	TOT (=)	78	59	137

Specificità: 95%  
Sensibilità: 91%  
Concordanza: 98%

C. Reattività incrociata: Sono stati testati per gli anticorpi anti-tTG IgA complessivamente 30 campioni: 10 positivi per anticorpi anti-nucleari, 10 positivi per gli anticorpi anti-zona della membrana basale (BMZ) e 10 per gli anticorpi

IT

anti-intercellulari. Nessuno è risultato positivo.

**Precisione:**

Campioni con concentrazioni note di anti-tTG IgA sono stati analizzati in 10 replicati nell'arco di un periodo di due settimane. Il coefficiente di variazione (CV) all'interno di uno stesso saggio e tra un saggio e l'altro è il seguente:

<b>Valore Anti-tTG IgA</b>	<b>Intra-piastra CV</b>	<b>Inter-piastra CV</b>
1. 186 EU/ml	5,3%	4,9%
2. 118 EU/ml	2,3%	4,9%
3. 51 EU/ml	9,2%	7,4%

**Recupero:**

I campioni con concentrazioni note di anticorpi anti-tTG IgA sono stati miscelati con diluizioni appropriate di un altro campione positivo con quantitativo noto di anticorpi anti-tTG IgA. I livelli di anticorpi anti-tTG IgA dei campioni miscelati sono stati determinati e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di recupero. I risultati sono i seguenti:

	<b>EU/ml addizionato</b>	<b>EU/ml ottenuto</b>	<b>% Recupero</b>
1.	151	162	107%
2.	126	140	111%



## ELISA para Anticorpos IgA Anti-Transglutaminase Tissular (tTG)

IVD

### FOLHETO DO PRODUTO

REF 1157 ELISA para Anticorpos IgA Anti-tTG 96 Determinações

#### APLICAÇÃO

É um exame de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a detecção e semiquantificação de anticorpos IgA anti-Transglutaminase tissular no soro humano para auxiliar o diagnóstico de doença celíaca.

#### RESUMO E EXPLICAÇÃO

A doença celíaca (DC) é uma patologia digestiva crónica provocada por uma reacção auto-imune ao glúten, uma proteína presente no trigo. É caracterizada por lesões nas vilosidades responsáveis pela absorção e hiperplasia das criptas no intestino delgado. Os sintomas incluem diarreia, perda de peso e anemia devido à deficiência de absorção de ferro e ácido fólico. A DC activa incrementa o risco de doenças gastrointestinais malignas<sup>1</sup>, infertilidade<sup>2</sup>, osteoporose<sup>3</sup> e epilepsia bem como outras síndromas neurológicas<sup>4</sup>. A Doença Celíaca é tratada com um dieta isenta de glúten.

A DC é comum na população caucasiana Europeia. Como a doença é induzida geneticamente e as populações caucasianas Europeia e Americana têm uma ascendência comum, suspeita-se que a prevalência real da DC nos Estados Unidos seja superior à registada no passado. Testes serológicos foram desenvolvidos para auxiliar o diagnóstico da DC (por ex.: anticorpos anti-endomisiais (EMA), IFA para anticorpos anti-reticulina e ELISA para anticorpos anti-gliadina ELISA). Recentemente, Dietrich et al.<sup>5</sup> identificaram o antígeno associado ao antígeno EMA como sendo transglutaminase tissular (tTG). Isso permitiu desenvolver um teste ELISA para anticorpos EMA que seria menos subjectivo do que os métodos típicos de imunofluorescência.

As Transglutaminases (EC 2.3.2.13) são uma família diversificada de enzimas dependentes de Ca<sup>2+</sup> com genes, estruturas e funções biológicas distintas<sup>6</sup>. Estas enzimas são ubíquas e altamente conservadas entre as espécies<sup>7</sup>. De todas as transglutaminases humanas, a tTG é a mais amplamente distribuída. Embora seja principalmente uma enzima intracelular, a tTG pode ser segregada pelas células e acumulada na matriz extracelular<sup>8</sup>. A tTG poderá ter um papel na estabilização da matriz extracelular, funcionando como um colante biológico altamente eficiente. Os auto-anticorpos contra a tTG podem perturbar ou interferir com o seu funcionamento normal, o que provoca as alterações histológicas e patológicas que se apresentam na DC. A tTG é um componente importante para o diagnóstico da DC<sup>5,9,10,11</sup>.

#### PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O antígeno Transglutaminase do Tecido liga-se aos poços de uma placa de micropoços em polistireno seguida pelo bloqueio dos locais não reactivos que não reagiram para reduzir a ligação não específica. Os controlos, calibradores e soro diluído do doente são deitados em poços separados, permitindo assim que todos os anticorpos anti-tTG presentes possam ligar-se ao antígeno imobilizado. A amostra que não se tiver ligado será eliminada por lavagem e será deitado um conjugado de IgA anti-humana marcado com enzima em cada poço. Estes anticorpos conjugados com enzima ligam-se especificamente à imunoglobulina humana da classe IgA. Depois de ter eliminado por lavagem o conjugado que não se tiver ligado, adiciona-se um substrato enzimático específico (pNPP) aos poços. Depois de ter interrompido a reacção enzimática, a intensidade da cor altera-se, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, e é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são apresentados em unidades ELISA por mililitro (UE/ml).

#### REAGENTES

##### Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congele.** Não utilize o reagente se não estiver límpido ou se apresentar precipitação. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20-25 °C) no momento da

utilização. Quando é conservado entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade indicada no kit. Reconstitua o tampão de lavagem em 1 litro de água destilada ou desionizada. As tiras de micropoços revestidas só devem ser utilizadas uma vez.

### Precauções

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais<sup>12</sup>.

AVISO: A azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação dessas azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

**As instruções devem ser seguidas exactamente como estão indicadas no folheto do kit para assegurar resultados válidos.** Não misture componentes do kit com componentes de outras origens que não sejam do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc.

Respeite as técnicas laboratoriais em vigor para reduzir a possibilidade de contaminação microbiana e química. Não use após a data de validade indicada no rótulo.

### Materiais fornecidos

ELISA para Anticorpos IgA Anti-tTG ImmuLISA™ **REF** 1157

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8	<b>MICROPLATE tTG</b>	<b>Microplaca</b> com micropoços individuais destacáveis revestidos com antígeno tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR A tTG</b> *	<b>Calibrador A pronto a usar</b> ( <i>tampa verde</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR B tTG</b> *	<b>Calibrador B pronto a usar</b> ( <i>tampa violeta</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR C tTG</b> *	<b>Calibrador C pronto a usar</b> ( <i>tampa azul</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR D tTG</b> *	<b>Calibrador D pronto a usar</b> ( <i>tampa amarela</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL + tTG</b> *	<b>Controlo positivo pronto a usar</b> ( <i>tampa vermelha</i> ). Contém soro humano positivo para tTG.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Controlo negativo pronto a usar</b> ( <i>tampa branca</i> ). Contém soro humano.
1 x 12 ml	<b>IgA-CONJ ALKPPOS</b> *	<b>Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina</b> pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente de soro</b> pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato enzimático</b> pronto a usar. Contém pNPP. <b>Proteger da luz.</b>

PT

1 x 12 ml **STOP**

**Solução de paragem** pronta a usar.

2 x **BUF WASH**

**Tampão de lavagem em pó.** Reconstituir cada unidade em um litro.

\* Contém < 0,1% NaN<sub>3</sub>

#### **Símbolos utilizados nos rótulos:**

**LOT** Número de lote

**REF** Número de catálogo

 Prazo de validade

 Temperatura de armazenamento

 Ler as instruções de utilização

**IVD** Utilização em diagnóstico in vitro

 Fabricante

 Número de testes

#### **Materiais necessários mas não fornecidos**

- Pipetas para 5 a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Água destilada ou desionizada
- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado para 600-650 nm.
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Temporizador
- Papel absorvente
- Lavador automático de microplacas com capacidade de distribuição de 200 µl

#### **COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA**

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o rendimento do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras de 2 a 8 °C e por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

#### **MODO DE PROCEDER**

##### **Notas sobre o modo de proceder**

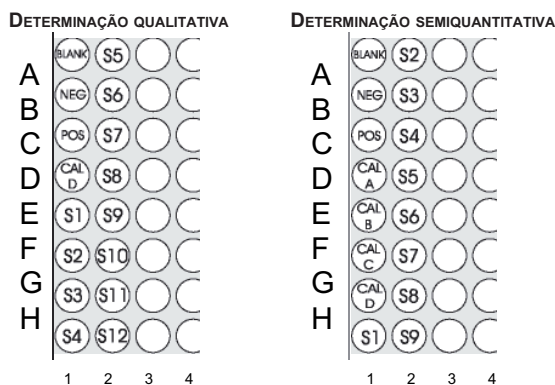
- Leia atentamente estas instruções antes de iniciar o teste.
- Deixe que todos os reagentes e amostras estabilizem à temperatura ambiente (20-26 °C) por 30 minutos. Guarde os produtos imediatamente no congelador depois do uso.
- Prepare todas as diluições das amostras do doente antes de iniciar o teste.
- **Guarde imediatamente as tiras não usadas no pacote com dessecantes e fechar bem para reduzir a exposição a vapor de água.**

PT

- Passo de lavagem: É imprescindível uma boa técnica. **Aconselha-se um lavador automático de microplacas.**
- Use uma pipeta multicanal com capacidade de distribuição em 8 poços simultaneamente. Isso torna mais rápido o processo e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Os tempos são muito importantes. Os períodos de incubação iniciam após a distribuição dos reagentes.

#### Método de teste

1. **OS REAGENTES DEVEM ESTAR TODOS À TEMPERATURA AMBIENTE (20-26° C) ANTES DE INICIAR O TESTE.**
2. Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nas microplacas. É uma boa prática de laboratório testar as amostras em duplicado.
3. **Determinação qualitativa:** use apenas o Calibrador D. **Determinação semiquantitativa:** use os Calibradores A - D como ilustrado no exemplo abaixo.



4. Prepare uma diluição da amostra do doente a **1:51** misturando **10 µl** da amostra do doente com **0,5 ml** de Diluente de Soro.
5. Junte **100 µl** de Calibradores, Controlos Positivo e Negativo e amostras do doente diluídas aos respectivos micropoços indicados na folha de protocolo 3  
**Nota:** Inclua um poço com **100 µl** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente. A absorvância deste poço não deve ser superior a 0,3.
6. Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  minutos) à temperatura ambiente numa superfície plana.
7. Passo de lavagem: Aspire muito bem o conteúdo de cada poço. Junte 200-300 µl do tampão de lavagem **reconstituído** a todos os poços e depois aspire. Repita esta sequência mais três vezes por um total de quatro lavagens. Vire a placa ao contrário e bata em material absorvente para eliminar todos os resíduos fluidos após a última lavagem. Não enxugue completamente os poços.
8. Junte 100 µl de Conjugado a cada poço.
9. Incube os poços por 30 minutos.
10. Passo de lavagem: Repita o passo 7.
11. Junte 100 µl de Substrato enzimático a cada poço.
12. Incube por 30 minutos à temperatura ambiente.
13. Adicione 100 µl de Solução de Paragem a cada poço. Mantenha a mesma sequência e tempos da Solução de Paragem como efectuado para o Substrato Enzimático. Leia a absorvância (OD) de cada poço a 405 nm no prazo de uma hora da interrupção da reacção.

PT

14. Leia a absorvância (OD) de cada poço a 405 nm usando um leitor de comprimento de onda simples ou duplo em relação ao branco de reagente definido em absorvância zero.

### Controlo de qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o branco de reagente devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvância do branco de reagente deverá ser  $< 0,3$ . O Calibrador A deverá ter uma leitura de absorvância não inferior a 1, caso contrário o teste deverá ser repetido. O controlo negativo deve ser  $< 20$  UE/ml. Se o teste for executado em duplicado, faça a média das duas leituras para determinar a concentração de anticorpos anti-hu tTG. Quando se efectuam determinações qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à do controlo positivo. Para determinações semiquantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado na ampola. Aconselhamos efectuar um teste das amostras que estiverem nos limites de leitura com amostras frescas recolhidas numa data posterior para assegurar a precisão.

## RESULTADOS

### Cálculos

As concentrações das amostras do doente podem ser determinadas em dois métodos:

#### 1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

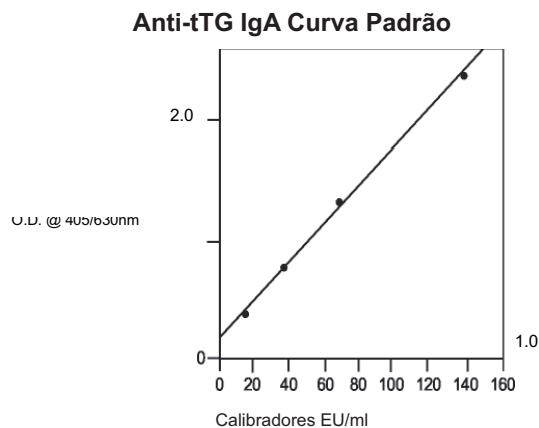
Abs. da Amostra de Teste

\_\_\_\_\_ X UE/ml de Calibrador D = UE/ml

Abs. da Amostra de Teste do Calibrador D

#### 2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Registe a absorvância dos Calibradores A a D em relação à respectiva concentração num papel milimétrico linear. Registe a concentração em UE/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e trace a curva de melhor ajuste. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva em relação ao correspondente valor de absorvância.



### Calibrador

Os calibradores são incluídos para assegurar uma semiquantificação e devem ser usados em todos os testes. As amostras de doente que contêm níveis altos de anticorpos podem dar valores de absorvância superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semiquantitativos com precisão, essas amostras devem ser mais diluídas de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando são novamente testadas. Para a determinação de UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de solução.

PT

### Interpretação

As seguintes informações servem apenas como guia na interpretação dos resultados de laboratório. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais.

Anti-tTG Valor	Interpretação
<20 UE/ml	Neg (-)
20 – 25 EU/ml	Indeterminado
>25 UE/ml	Pos (+)

### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O teste para IgA anti-tTG Immulisa™ não deve ser efectuado em amostras muito hemolisadas, contaminadas com micróbios ou lipémicas. Este método só deve ser utilizado para testar amostras de soro humano. Os resultados obtidos servem apenas como auxílio no diagnóstico e não devem ser interpretados como um verdadeiro diagnóstico. Em doentes com DC com deficiência de IgA o anti-tTG deverá ser negativo.

### VALORES PREVISTOS

Os valores previstos numa população normal são negativos (< 20 UE/ml nos adultos e crianças). Todavia, foi determinado que alguns indivíduos assintomáticos, aparentemente saudáveis podem dar resultados positivos aos anticorpos IgA anti-tTG.

A incidência de anticorpos anti-tTG foi estudada pelos diversos investigadores e as suas descobertas foram resumidas na Tabela 1 na página 42.

A incidência e os níveis de anticorpos anti-tTG dependem do estado da dieta. Os níveis destes anticorpos diminuem e possivelmente tornam-se negativos em doentes com DC mas que estão a seguir uma dieta sem glúten. Do mesmo modo, os níveis destes anticorpos ou dos anticorpos anti-tTG poderão tornar-se positivos quando os doentes com DC que estão a seguir uma dieta sem glúten, ingerem alimentos com glúten<sup>9, 10</sup>.

### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade do ELISA para Anticorpos IgA Anti-hu tTG Immulisa™ foi determinada comparando os resultados com:

- outro método ELISA para IgA anti-tTG obtido no comércio e
- método de imunofluorescência de anticorpos anti-endomisiais ImmuGlo™.

Intervalo normal: Foi testado um total de 213 amostras. Dessas, 64 provinham de dadores de sangue normais e 149, obtidas num laboratório de referência, deram resultado negativo a anticorpos endomisial. Dessas 213 amostras testadas a anticorpos a tTG, apenas 3 deram resultado positivo, dando 99% de especificidade ao teste.

### Especificidade e sensibilidade comparativas

A. Anticorpos Endomisial contra ELISA para Anticorpos IgA anti-tTG Immulisa™: Foi testado um total de 244 amostras para anticorpos contra o endomísio usando um kit para anticorpos anti-endomisiais ImmuGlo™ e os resultados de anticorpos anti-endomisiais foram comparados com o método ELISA para IgA anti-tTG Immulisa™. Os resultados estão abaixo resumidos:

		IgA anti-tTg Immco™		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Immco™ EMA	POS (+)	86	9	95
	NEG (-)	1	148	149
	TOT (=)	87	157	244

especificidade relativa: 96%

sensibilidade relativa: 91%

concordância relativa: 99%

PT

B. ELISA para Anticorpos Anti-tTG **Immuliisa™** contra outro método ELISA IgA Anti-tTG comercial: Foi testado um total de 137 amostras com um kit para anticorpos IgA anti-tTG **Immuliisa™** e com outros kits para IgA anti-tTG obtidos no comércio. Os resultados foram os seguintes:

		<b>IgA anti-tTg Immco™</b>		
		<b>POS (+)</b>	<b>NEG (-)</b>	<b>TOT (=)</b>
<b>Outro ELISA</b>	<b>POS (+)</b>	77	5	82
	<b>NEG (-)</b>	1	54	55
	<b>TOT (=)</b>	78	59	137

especificidade relativa: 95%

sensibilidade relativa: 91%

concordância relativa: 98%

C. Reactividade cruzada: Foi testado um total de 30 amostras, 10 de cada positivas a anticorpos antinucleares, anti-zona membrana basal (BMZ) e anti-intercelular (IC), para anticorpos IgA anti-tTG. Nenhuma deu resultado positivo.

**Precisão:**

As amostras com concentrações conhecidas de IgA anti-tTG foram testadas em 10 repetições durante duas semanas. O coeficiente de variação (CV) intra- e inter-testes foi o seguinte:

<b>IgA Anti-tTG</b>	<b>Intra-Placa CV</b>	<b>Inter-Placa CV</b>
1. 186 EU/ml	5,3%	4,9%
2. 118 EU/ml	2,3%	4,9%
3. 51 EU/ml	9,2%	7,4%

**Recuperação:**

As amostras com concentrações conhecidas de IgA anti-tTG foram misturadas com diluições apropriadas de outra amostra positiva com quantidades conhecidas de IgA anti-tTG. Os níveis de anticorpos IgA Anti-tTG das amostras misturadas foram determinados e dos valores obtidos foi calculada a percentagem de recuperação. Os resultados são os seguintes:

	<b>UE/ml adicionado</b>	<b>UE/ml obtido</b>	<b>% Recuperação</b>
1.	151	162	107%
2.	126	140	111%

## REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

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 trans-glutaminase. *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.

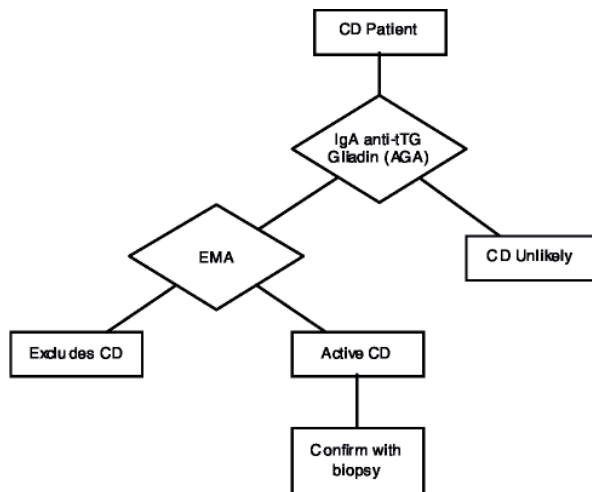
**Table 1: Anti-tTG Incidence: GSE**

Disease/Research	Disease (Sensitivity)	Control (Specificity)
Celiac Disease	104/106 (98%)	6/14 (96%)
Dietrich W et al <sup>10</sup>	129/136 (95%)	13/207 (94%)
Sulkanen S et al <sup>9</sup>		
Dermatitis Herpetiformis	43/61 (70%)	2/84 (98%)
Dietrich W et al <sup>13</sup>		

**Table 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

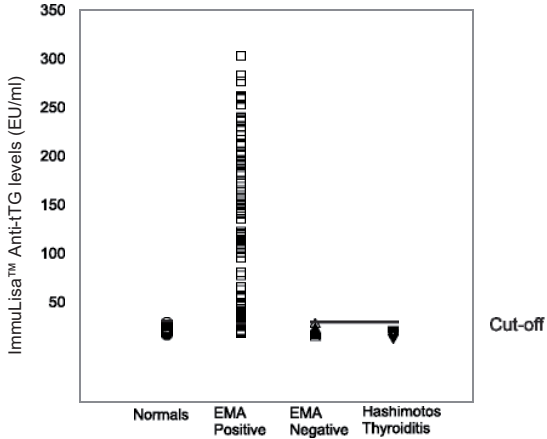
**Figure 1: Laboratory Testing Algorithm**



**Table 3: Incidence of Anti-tTG IgA Autoantibodies**

Disease Group	No. of Cases	# Pos	% Pos
<b>Celiac Disease (CD)</b>			
Gluten Diet (untreated)	43	39	91
Gluten free diet	63	13	21
<b>Dermatitis Herpetiformis (DH)</b>	66	45	68
<b>Insulin Dependent Diabetes</b>	136	18	13
<b>Other Disorders</b>			
Pemphigus	72	1	2
Pemphigoid	70	7	10
Thyroid Disorders	80	1	1
ANA Positive	51	0	0
AMA Positive	10	0	0
<b>Normals</b>			
Adults	91	3	5
Children	111	5	5

**Figure 2: Distribution of Anti-tTG IgA in Celiacs, Normals and Controls**









*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](mailto: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

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)