



Anti-human Tissue Transglutaminase (hu tTG) Screen IgG/IgA ELISA

IVD

PRODUCT INSERT

REF 38066 tTG Screen ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and semiquantitation of anti-human Tissue Transglutaminase antibodies in human serum to aid in the diagnosis of celiac disease (CD) and dermatitis herpetiformis (DH).

SUMMARY AND EXPLANATION

Celiac Disease and Dermatitis Herpetiformis are autoimmune gastrointestinal disorders that may occur in genetically susceptible individuals triggered by the ingestion of gluten-containing grains such as wheat, barley and rye. CD is characterized by malabsorption resulting from inflammatory injury to the small intestinal mucosa and, when prolonged, can cause malnutrition. The classical symptoms of CD include diarrhea, weight loss and malnutrition. Only a small percentage of patients with CD, however, presents with classical symptoms. Studies have found the prevalence of CD to be highly variable from population to population¹. The true prevalence has been difficult to ascertain. If only the clinical criteria are used in determining prevalence, the incidence of CD is much lower as compared with incidence established by serological methods^{1,2}. Using serological methods the incidence of CD in the general population is approximately one in

200. Failure to diagnose CD early may predispose an individual to long-term complications such as splenic atrophy and intestinal lymphoma. A gluten-free diet (GFD) normalizes the mucosa and helps reduce the malignant potential^{3,4}. Histological examination of the small intestinal biopsy remains the gold standard for diagnosing CD, but it has limitations as well. For example, certain patients with latent or even active CD may have normal histopathology⁵. DH is differentiated from CD in that DH patients present with pruritic, itchy, vesiculo-bullous disorders of the skin in addition to underlying gluten enteropathy.

The revised European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) criteria include only a single biopsy with clear-cut remission of clinical symptoms on GFD⁶. Positive serology at the time of diagnosis with disappearance on GFD contributes to the diagnosis. The various serological tests employed in the work-up of patients suspected to have CD include anti-gliadin antibody (AGA), anti-endomysial antibody (EMA), anti-reticulin antibody (ARA) and anti-tissue transglutaminase (tTG) antibody tests.

Since identification of tTG as the endomysial antigen, ELISA methods have been described for detecting antibodies in the sera of patients with CD. The advantage of the anti-tTG antibody assay is that it is automatable and less subjective than EMA. For this reason, many laboratories have opted to use the tTG antibody method as the screening assay. In various studies on the efficacy of the tTG antibody method for screening for CD, the specificity and sensitivity of this method has been found to range from 90 to 95%⁷. Human tTG has been described to improve the sensitivity of the tTG antibody assay for CD.

Most of the assays detect antibodies to tTG of the IgA isotype. This has some limitations as IgA deficient CD patients may yield false negative serology⁸. This may compromise the utility of the serum antibody methods in detecting all CD cases^{9,10}. IgA deficiency is a common immunodeficiency, found in one in 500-700¹¹⁻¹³

healthy blood donors. To prevent false negative results it is necessary to have a method that can detect antibodies to both immunoglobulin isotypes (IgA and IgG) against tTG.

PRINCIPLES OF PROCEDURES

The anti-hu tTG Total antibody test is performed as a solid phase immunoassay (ELISA). Microwells are coated with recombinant hu tTG antigen followed by blocking the unreacted sites to reduce nonspecific binding. Controls, calibrators and patient serum samples are incubated in the antigen coated wells, which allow anti-tTG antibodies present in the serum to bind. Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Antibodies bound to the microwells are detected by adding enzyme labeled polyvalent anti-human immunoglobulin

conjugate to the wells. These enzyme conjugated antibodies bind specifically to the human immunoglobulin that are bound to tTG on the microwells. Unbound enzyme conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies to hu tTG is detected by a color change produced by the conversion of the pNPP substrate. The reaction is stopped and 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 licensed tests. However, human blood derivatives and patient specimens should always be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁴.

WARNING - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same lot number from A. Menarini Diagnostics S.r.l.. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use beyond expiration date on the label.

Materials Provided

Menarini™ tTG Screen ELISA **REF** 38066

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	MICROPLATE hu-tTG	Microplate with individual breakaway microwells coated with hu tTG antigen.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A hu-tTG Screen *	Ready to use Calibrator A (green cap). Human serum containing antibodies to tTG.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B hu-tTG Screen *	Ready to use Calibrator B (violet cap). Human serum containing antibodies to tTG.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C hu-tTG Screen *	Ready to use Calibrator C (blue cap). Human serum containing antibodies to tTG.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D hu-tTG Screen *	Ready to use Calibrator D (yellow cap). Human serum containing antibodies to tTG.
1 x 1.5 ml	CONTROL + hu- tTG Screen *	Ready to use Positive Control (red cap). Contains human serum positive for tTG.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use Negative Control (white cap). Contains human serum.



1 x 12 ml	IgA/IgG-CONJ	ALKPHOS *
1 x 60 ml	DIL *	
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	
1 x 12 ml	STOP	
2 x	BUF	WASH

Ready to use **anti-human Alk. Phos. Conjugate**. Color coded pink.

Ready to use **Serum Diluent**. Color coded blue.

Ready to use **Enzyme Substrate**. Contains pNPP. **Protect from light**.

Ready to use **Stop Solution**.

Powder **Wash Buffer**. Reconstitute to one liter each.

* Contains < 0.1% NaN₃

Symbols used on labels:

LOT Lot number

REF Catalog number

Use by

Storage temperature

Read instructions for use

IVD In vitro diagnostic use

Manufacturer

Number of Tests

*Contains <0.1% NaN₃

Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettors capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper
- 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.
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

Other available serological tests to aid in the Diagnosis of CD

Menarini™ Anti-Endomysial Antibody Test (Primate Distal Esophagus) (6x8 well slide) **REF** 38060

Menarini™ Anti-Endomysial Antibody Test (Primate smooth muscle) (8x6 well slide) **REF** 37790

Menarini™ Anti-gliadin Antibody (AGA) IgA ELISA **REF** 37789

Menarini™ Anti-gliadin Antibody (AGA) IgG ELISA **REF** 37809

Menarini™ Anti-gliadin Antibody (AGA) screen ELISA **REF** 37979

Menarini™ Anti-hu tTG Antibody IgA ELISA **REF** 37795

Menarini™ Anti-hu tTG Antibody IgG ELISA **REF** 37796



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 freeze and thaw of samples.

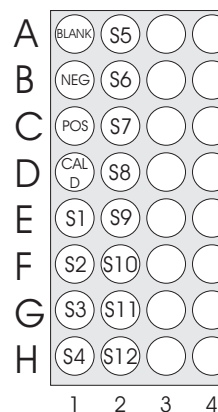
PROCEDURE PROCEDURAL NOTES

- Before starting with the assay read carefully the product insert.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate at room temperature for at least 30 minutes before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Good washing technique is critical. If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **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.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.

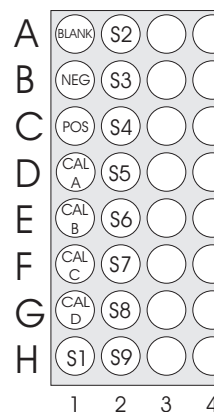
Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate at room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a **qualitative determination** use only the Ready to Use Low Calibrator D (*vial with yellow cap*).
 or For a **semi-quantitative determination** use the Ready to Use Calibrators A through D as depicted in the sample layout below.

QUALITATIVE DETERMINATION



SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION


Specimen Layout



- Step 4** Prepare a **1:51** dilution of the patient samples by mixing **10 µl** of the patient sera with **0.5 ml** of Serum Diluent.
- Step 5** Pipette **100 µl** of Ready to Use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples to the appropriate microwells as per protocol sheet.
- Note:** Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank. The absorbance of the reagent blank should not be more than 0.3 when read against air.
- Step 6** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 7** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 8** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 9** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 10** Wash all microwells as in Step 7.
- Step 11** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 12** Incubate **microwells 30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 13** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance within 1 hour of adding Stop Solution.
- Step 14** Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or 405/ 630nm 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. 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

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

1. QUALITATIVE DETERMINATION

Results obtained by this method should be reported as positive or negative.

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

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

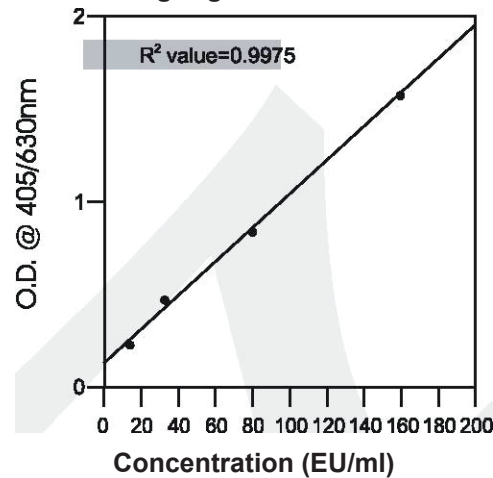
Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of patient samples on the curve against the corresponding absorbance value.



Calibrator

The ready to use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such serum samples 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.

Anti-hu tTG Total IgA/IgG Menarini™ Standard Curve



Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. These values were determined by testing 113 adult normal blood donors. The values depicted below are the mean of the normal subjects plus 3SD. Each laboratory must determine its own normal values.

anti-hu tTG value	Interpretation
<20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	Positive

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The Menarini™ anti-hu tTG 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.

EXPECTED VALUES

The expected values in a normal population are negative (<20 EU/ml). In patients with CD the incidence of IgA anti-tTG antibodies has been described in 82-100% of patients with active CD with a specificity of 76-99%¹⁵. Combined detection of IgG and IgA anti-tTG antibodies as described by Seissler et al provided 95% sensitivity with 99% specificity¹⁶. 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 and may become positive when patients with CD who were on a gluten-free diet ingest a gluten-containing diet¹⁷⁻²¹.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the Menarini™ anti-hu tTG Total Antibody ELISA was determined by comparing the results with:

- Clinical findings.
- Comparison to endomysial antibody (EMA)



Normal Range: The normal range was established by testing 65 serum samples from apparently healthy donors obtained from the Red Cross. The mean plus three standard deviations of the mean of this normal population was used to determine the cut-off between normal and borderline positive individuals.

Comparative Specificity and Sensitivity:

A. Clinical Correlation: A total of 200 serum specimens obtained on patients with CD with and without IgA deficiency; various disease controls including sera from patients with clinical diagnosis of the blistering diseases pemphigus, pemphigoid, and another dermatological disorder, psoriasis; and normal subjects were tested for total anti-hu tTG antibodies. The incidence of total anti-tTG antibodies in CD and other disease controls is as below. Four normals who were found positive were weakly positive.

Diagnosis	No Tested	No. Positive
Celiac Disease	94	75*
IgA deficient		
Celiac	15	15
Non-Celiac	13	0
Dermatitis herpetiformis	22	14
Disease Controls	56	2
Normal	65	4

*The 19 Celiac Samples that were negative for total tTG, were tested on both tTG IgG ELISA and tTG IgA ELISA. In all cases the 19 samples were negative on the two different ELISA tests. Most likely, these patients were on a gluten free diet.

B. Total anti-hu tTG ELISA vs. -endomysial antibody (EMA): A total of 200 samples were tested on the Menarini™ total anti-hu tTG antibody kit and EMA test kit. Two of the four samples positive on Menarini™ total tTG and negative on the EMA were sera from patients with DH and were weak positives. The other two false positives were within the Pemphigus/Pemphigoid disease population set. Three of the five samples negative on Menarini™ total tTG kit and positive on EMA had titers of 10 or less. The other samples in the CD subset had titers of 40 and 20 with 14.6EU/ml and 19.8EU/ml results respectively.

		Menarini™ EMA		
		Positive	Negative	Total
Menarini™ anti-hu total tTG	Positive	102	4	106
	Negative	5	89	94
	Total	107	93	200

Relative Agreement: 96%

Relative Sensitivity: 95%

Relative Specificity: 96%

C. Cross Reactivity: A total of 56 controls (patients with connective tissue disorders such as psoriasis, autoimmune bullous disorders such as pemphigus and pemphigoid) were tested. Two were found weakly positive.

Precision:

Based on 10 replicates, the intra-assay and inter-assay Coefficient of Variation (CV) of the total anti-hu tTG ELISA test were calculated.



	Inter-assay CV	intra-assay CV
High	5.5%	3.8%
Medium	9.7%	5.8%
Low	8.5%	6.4%
Cut-off (20 EU/ml)	11%	9%

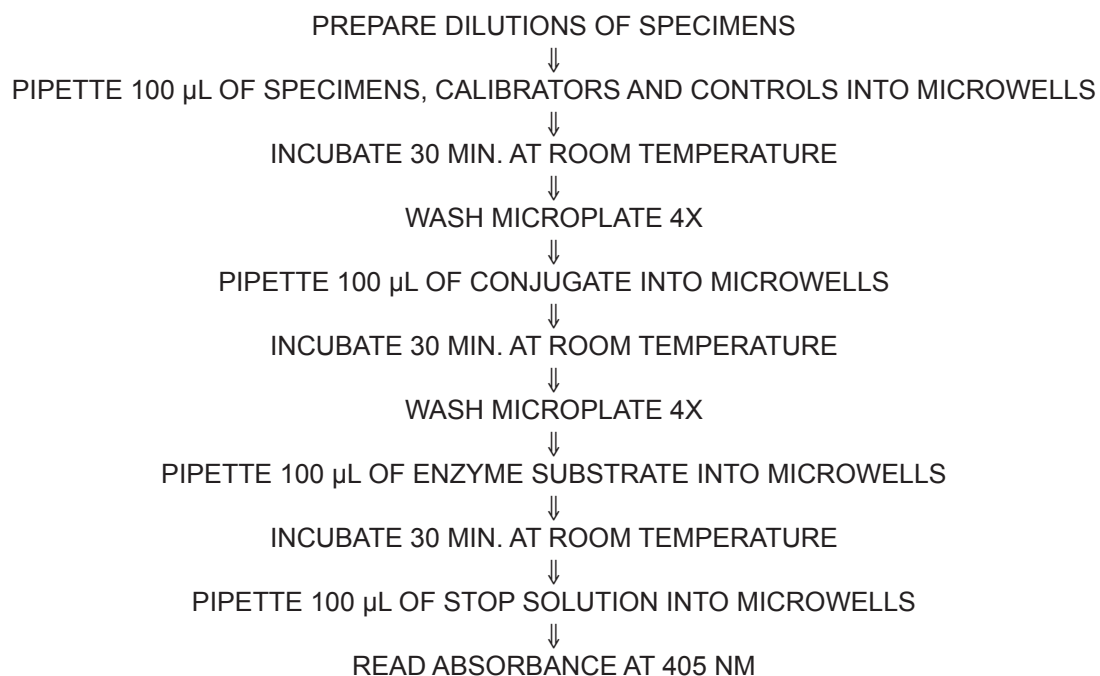
Linearity:

To determine acceptable linearity, plates were assayed with calibrators of known values. The r-squared values of the standard curve were determined. An r-squared value greater than 0.95 is deemed to be acceptable. The average r-squared value for this assay 0.9975. No value was lower than 0.9929.

Recovery:

Samples with known IgG anti-hu tTG antibody concentrations were mixed with appropriate dilutions of another positive sample with known amounts of anti-tTG antibody. Anti-hu tTG antibody levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery calculated. The results are as follows:

	Anti-hu tTG Abs. conc. added (EU/ml)	Anti-hu tTG Abs. conc. obtained (EU/ml)	% Recovery
Sample 1	54.1	53.7	99.4
Sample 2	73.8	86.5	117.2
Sample 3	89.3	106.1	118.7

Menarini™ PROCEDURE AT A GLANCE




IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 38066 Μέθοδος ELISA διαλογής για αντισώματα κατά της ιστικής τρανσγλουταμινάσης (tTG) 96 προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσοροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων κατά την ανθρώπινης ιστικής τρανσγλουταμινάσης σε ορό ανθρώπου, ως βοήθημα για τη διάγνωση της νόσου κοιλιοκάκης (ΚΚ) και της ερπητοειδούς δερματίτιδας (ΕΔ).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η νόσος κοιλιοκάκη και η ερπητοειδής δερματίτιδα είναι αυτοάνοσες γαστρεντερικές διαταραχές, οι οποίες ενδέχεται να εμφανιστούν σε άτομα με γενετική προδιάθεση, προκαλούμενες από την πρόσληψη δημητριακών που περιέχουν γλουτένη, όπως είναι το σιτάρι, το κριθάρι και η σίκαλη. Η ΚΚ χαρακτηρίζεται από δυσαπορρόφηση, που προκύπτει από φλεγμονώδη βλάβη στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου και η οποία, εάν παραταθεί, μπορεί να προκαλέσει υποσιτισμό. Τα τυπικά συμπτώματα της ΚΚ περιλαμβάνουν διάρροια, απώλεια βάρους και υποσιτισμό. Ωστόσο, μόνο ένα μικρό ποσοστό των ασθενών με ΚΚ παρουσιάζουν τα τυπικά συμπτώματα. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο επιπολασμός της ΚΚ ποικίλλει από πληθυσμό σε πληθυσμό.¹ Έχει αποδειχθεί δύσκολο να εξακριβωθεί ο αληθινός επιπολασμός της νόσου. Εάν στον προσδιορισμό του επιπολασμού χρησιμοποιηθούν μόνο κλινικά κριτήρια, η συχνότητα εμφάνισης της ΚΚ βρίσκεται να είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτή που προκύπτει από ορολογικές μεθόδους^{1,2}. Χρησιμοποιώντας ορολογικές μεθόδους, η συχνότητα εμφάνισης της ΚΚ στο γενικό πληθυσμό είναι περίπου ένα άτομο στα 200. Η αποτυχία έγκαιρης διάγνωσης της ΚΚ ενδέχεται να οδηγήσει σε προδιάθεση για μακροχρόνιες επιπλοκές, όπως είναι η ατροφία του σπλήνα και το λέμφωμα του εντέρου. Η δίαιτα ελεύθερη γλουτένης (ΔΕΓ) επαναφέρει το βλεννογόνο σε φυσιολογική κατάσταση και βοηθά ώστε να μειωθεί η πιθανότητα εμφάνισης νεοπλασιών^{3,4}. Η ιστολογική εξέταση βιοψίας από το λεπτό έντερο παραμένει η καλύτερη μέθοδος διάγνωσης της ΚΚ, αλλά έχει περιορισμούς. Για παράδειγμα, ορισμένοι ασθενείς με λανθάνουσα ή ακόμη και ενεργή ΚΚ, ενδέχεται να εμφανίζουν φυσιολογική ιστοπαθολογία.⁵ Η ΕΔ διακρίνεται από την ΚΚ στο ότι οι ασθενείς που πάσχουν από αυτήν, εκτός από την υποκείμενη εντεροπάθεια από γλουτένη, εμφανίζουν κνησμούς, φυσαλλιδώδεις-πομφολυγώδεις διαταραχές του δέρματος.

Τα αναθεωρημένα κριτήρια της Ευρωπαϊκής Εταιρίας Παιδιατρικής Γαστρεντερολογίας και Διατροφής (ESPGAN) περιλαμβάνουν μία μόνο βιοψία, με σαφή ύφεση των κλινικών συμπτωμάτων έπειτα από ΔΕΓ⁶. Ο θετικός ορολογικός έλεγχος τη στιγμή της διάγνωσης, με εξαφάνιση μετά από ΔΕΓ, συνεισφέρει στη διάγνωση. Οι διάφορες ορολογικές εξετάσεις που εφαρμόζονται στην εξέταση ασθενών που πιθανόν να πάσχουν από ΚΚ, περιλαμβάνουν εξετάσεις ανίχνευσης αντισωμάτων κατά της γλιαδίνης (AGA), ενδομυικών αντισωμάτων (EMA), αντισωμάτων κατά της ρετικουλίνης (ARA) και κατά της ιστικής τρανσγλουταμινάσης (tTG).

Αφότου η tTG αναγνωρίστηκε ως το ενδομυϊκό αντιγόνο, έχουν περιγραφεί μέθοδοι ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων στους ορούς ασθενών με ΚΚ. Το πλεονέκτημα της μεθόδου προσδιορισμού αντι-tTG αντισωμάτων, είναι ότι μπορεί να αυτοματοποιηθεί και είναι λιγότερο υποκειμενική από την ανίχνευση EMA. Για το λόγο αυτό, πολλά εργαστήρια έχουν επιλέξει να χρησιμοποιούν τη μέθοδο ανίχνευσης αντισωμάτων κατά της tTG ως εξέταση διαλογής. Σε διάφορες μελέτες σχετικά με την αποτελεσματικότητα της μεθόδου ανίχνευσης αντισωμάτων κατά της tTG ως εξέταση διαλογής για την ΚΚ, η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου αυτής βρέθηκε να κυμαίνεται από 90 έως 95%.⁷ Η ανθρώπινη tTG έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την ευαισθησία της μεθόδου προσδιορισμού αντισωμάτων κατά της tTG, για την ΚΚ.

Οι περισσότερες από τις μεθόδους ανιχνεύουν αντισώματα κατά της tTG του IgA ισότυπου. Αυτό δημιουργεί ορισμένους περιορισμούς, καθώς οι ασθενείς που πάσχουν από ΚΚ και έχουν ανεπάρκεια σε IgA ενδέχεται να δώσουν ψευδώς αρνητικές ορολογικές εξετάσεις⁸. Αυτό ενδέχεται να διακυβεύσει τη χρησιμότητα των μεθόδων αντισωμάτων ορού στην ανίχνευση όλων των περιστατικών ΚΚ^{9,10}. Η ανεπάρκεια σε IgA είναι μία από τις πιο κοινές ανοσοανεπάρκειες, καθώς εμφανίζεται σε έναν ανά 500-700 υγιείς αιμοδότες¹¹⁻¹³. Για να αποφευχθούν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, είναι απαραίτητη η χρησιμοποίηση μιας μεθόδου που μπορεί να ανιχνεύσει αντισώματα και των δύο ισότυπων ανοσοσφαιρίνης (IgA και IgG) που παράγονται κατά της tTG.



ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Η ανάλυση ολικών αντισωμάτων κατά της ανθρώπινης ιστικής τρανσγλουταμινάσης διενεργείται ως μια ανοσολογική μέθοδος στερεάς φάσης (ELISA). Οι μικροκυψελίδες επικαλύπτονται με ανασυνδυασμένο ανθρώπινο αντιγόνο tTG και, στη συνέχεια, τα σημεία που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των αντισωμάτων αντι-tTG του ορού. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν στις μικροκυψελίδες ανιχνεύονται με την προσθήκη ενός σημασμένου με ένζυμο πολυδύναμου συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης. Αυτά τα συζευγμένα με ένζυμο αντισώματα δεσμεύονται ειδικά στην ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη που είναι δεσμευμένη στην tTG στις μικροκυψελίδες. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα με το ένζυμο απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες ειδικό ενζυμικό υπόστρωμα (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων κατά της ανθρώπινης tTG με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος pNPP. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται με 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 εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει πάντα να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹⁴.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) 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 παρτίδας της A. Menarini Diagnostics S.r.l.. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μικροβιακής ή διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό τους. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA διαλογής για αντισώματα κατά της ιστικής τρανσγλουταμινάσης (tTG) Menarini™ **REF** 38066

Κάθε kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8

MICROPLATE hu-tTG

Πλακίδιο ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με αντιγόνο ανθρώπινης tTG.



1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A hu-tTG Screen *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής A (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της tTG.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B hu-tTG Screen *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής B (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της tTG.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C hu-tTG Screen *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής C (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της tTG.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D hu-tTG Screen *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής D (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της tTG.
1 x 1,5 ml	CONTROL + hu- tTG Screen *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για την tTG.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα αρνητικού ελέγχου (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	IgA/IgG-CONJ ALKPHOS *	Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	DIL *	Έτοιμο προς χρήση αραιωτικό διάλυμα ορού . Χρώματος μπλε.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Έτοιμο προς χρήση ενζυμικό υπόστρωμα . Περιέχει ρ-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). Να προστατεύεται από το φως .
1 x 12 ml	STOP	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα τερματισμού .
2 x	BUF WASH	Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

* Περιέχει < 0,1% NaN₃

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT Αριθμός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου

Ημερομηνία λήξης

Θερμοκρασία αποθήκευσης

Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

IVD In vitro διαγνωστική χρήση

Κατασκευαστής

Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα



- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 µl έως 1000 µl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικό χαρτί
- 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.
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 µl

Άλλες διαθέσιμες ορολογικές εξετάσεις για την υποβοήθηση της διάγνωσης της ΚΚ

Ανάλυση αντισωμάτων κατά του ενδομυϊού Menarini™ (άπω οισοφάγος πρωτευνόντων) (6x8 αντικειμενοφόροι κυψελίδων)	REF 38060
Ανάλυση αντισωμάτων κατά του ενδομυϊού Menarini™ (λείος μυϊκός ιστός πρωτευνόντων) (6x8 αντικειμενοφόροι κυψελίδων)	REF 37790
Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgA κατά της γλιαδίνης (AGA) Menarini™	REF 37789
Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgG κατά της γλιαδίνης (AGA) Menarini™	REF 37809
Μέθοδος ELISA διαλογής για αντισώματα κατά της γλιαδίνης (AGA) Menarini™	REF 37979
Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgA κατά της ανθρώπινης tTG Menarini™	REF 37795
Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgG κατά της ανθρώπινης tTG Menarini™	REF 37796

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλου βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για πιο μακροχρόνια φύλαξη, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις της διαδικασίας

- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος.
- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια της ανάλυσης να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου, επί τουλάχιστον 30 λεπτά, προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Επιστρέψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών πρέπει να προετοιμαστούν προτού ξεκινήσει η ανάλυση.
- Είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής έκπλυσης. Εάν η έκπλυση δεν εκτελείται αυτόματα, επαρκής έκπλυση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας μια ισχυρή ριπή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από μια φιάλη έκπλυσης με ευρύ ακροφύσιο κατά μήκος ολόκληρου του πλακιδίου. **Συνιστάται η χρήση 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.
- Σε όλα τα βήματα είναι σημαντικός ο προσεκτικός έλεγχος των χρόνων. Όλες οι περίοδοι επώασης ξεκινούν με την ολοκλήρωση της προσθήκης του αντιδραστηρίου.
- Η προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με τον ίδιο ρυθμό και με την ίδια σειρά.
- Αφαιρέστε από τη θήκη τις απαιτούμενες ταινίες μικροκυψελίδων και επανασφραγίστε προσεκτικά τη θήκη ώστε να αποτραπεί τυχόν συμπύκνωση υδρατμών στις αχρησιμοποίητες μικροκυψελίδες. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.

Μέθοδος ανάλυσης

- Βήμα 1** Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Βήμα 2** Σημάνετε το φύλλο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στις μικροκυψελίδες. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.
- Βήμα 3** Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο τον έτοιμο προς χρήση Βαθμονομητή D χαμηλής συγκέντρωσης (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα)
 ή Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τους έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές A έως D, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διαμόρφωση δειγμάτων.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

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

ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

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

- Βήμα 4** Προετοιμάστε μια αραιώση των δειγμάτων ασθενών σε αναλογία **1:51**, αναμιγνύοντας **10 μl** των ορών ασθενών με **0,5 ml** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
- Βήμα 5** Προσθέστε **100 μl** έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενών στις κατάλληλες μικροκυψελίδες, όπως υποδεικνύεται στο φύλλο πρωτοκόλλου.
Σημείωση: Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριο. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριο. Η απορρόφηση του τυφλού αντιδραστήριου δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,3 όταν μετράται έναντι του αέρα.
- Βήμα 6** Επώαστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 7** Εκπλύνετε **4 φορές** με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Για μη αυτόματη έκπλυση, πληρώστε κάθε μικροκυψελίδα με ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας το πλακίδιο και κτυπώντας το ελαφρά ώστε να αδειάσουν όλες οι κυψελίδες ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κυψελίδα. Για να στυπώσετε στο τέλος της τελευταίας έκπλυσης, αναστρέψτε τις ταινίες και κτυπήστε δυνατά τις κυψελίδες επάνω σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές έκπλυσης, προγραμματίστε τη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 8** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 9** Επώαστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 10** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 7.
- Βήμα 11** Προσθέστε **100 μl** ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε μικροκυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 12** Επώαστε **τις μικροκυψελίδες επί 30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 13** Προσθέστε **100 μl** διαλύματος τερματισμού σε κάθε μικροκυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το ενζυμικό υπόστρωμα. Διαβάστε την απορρόφηση εντός 1 ώρας από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 14** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **405 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος 405/630 nm, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριο, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου 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 των ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με αυτή τη μέθοδο θα πρέπει να αναφέρονται ως θετικά ή ως αρνητικά.

Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος

----- X EU/ml του βαθμονομητή D = EU/ml εξεταζόμενου δείγματος

Απ/ση του Βαθμονομητή D

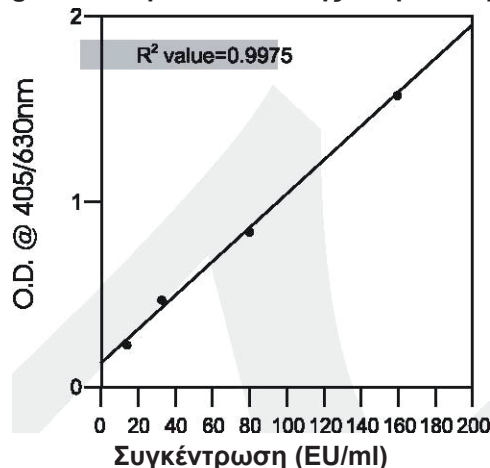
2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

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.

Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για 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 A. 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 με το συντελεστή αραιώσης.

Πρότυπη καμπύλη διαλογής IgA/IgG αντισωμάτων κατά της ανθρώπινης tTG Menarini™





Ερμηνεία

Τα παρακάτω παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Αυτές οι τιμές προσδιορίστηκαν με την ανάλυση δειγμάτων 113 φυσιολογικών ενηλίκων αιμοδοτών. Οι τιμές που απεικονίζονται παρακάτω είναι η μέση τιμή των φυσιολογικών ατόμων συν 3 τυπικές αποκλίσεις. Κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

Τιμή αντι-hu tTG	Ερμηνεία
< 20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Απροσδιόριστο (οριακό)
>25 EU/ml	Θετικό

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η μέθοδος προσδιορισμού αντισωμάτων κατά της ανθρώπινης tTG Menarini™ δεν θα πρέπει να εκτελείται σε δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού 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.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Οι αναμενόμενες τιμές σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρνητικές (<20 EU/ml). Σε ασθενείς με ΚΚ, η παρουσία των IgA αντισωμάτων κατά της tTG έχει περιγραφεί στο 82-100% των ασθενών με ενεργή ΚΚ, με ειδικότητα 76-99%¹⁵. Η συνδυασμένη ανίχνευση IgG και IgA αντισωμάτων κατά της tTG, όπως περιγράφεται από τους Seissler et al., παρουσίασε ευαισθησία 95% και ειδικότητα 99%¹⁶. 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 και ενδέχεται να γίνουν θετικά, όταν οι ασθενείς με ΚΚ που ακολουθούσαν δίαιτα ελεύθερη γλουτένης, περάσουν σε δίαιτα που περιέχει γλουτένη¹⁷⁻²¹.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα της μεθόδου ELISA διαλογής για αντισώματα κατά της tTG Menarini™ προσδιορίστηκε συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με:

- α) Κλινικά ευρήματα.
- β) Σύγκριση με αντι-ενδομυϊκά αντισώματα (EMA).

Φυσιολογικό εύρος: Το φυσιολογικό εύρος καθορίστηκε με την ανάλυση 65 δειγμάτων ορού από φαινομενικά υγιείς δότες που προήλθαν από τον Ερυθρό Σταυρό. Για τον προσδιορισμό της οριακής τιμής (cut-off) μεταξύ των φυσιολογικών και των οριακά θετικών ατόμων, χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή συν τρεις τυπικές αποκλίσεις της μέσης τιμής αυτού του φυσιολογικού πληθυσμού.

Συγκριτική ειδικότητα και ευαισθησία:

A. Κλινική συσχέτιση: Ένα σύνολο 200 δειγμάτων ορού που συλλέχθηκαν από ασθενείς με ΚΚ με ή χωρίς ανεπάρκεια σε IgA, διάφοροι μάρτυρες της νόσου, συμπεριλαμβανομένων ορών από ασθενείς με κλινική διάγνωση των εξανθηματικών νόσων φλύκταινα και πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, καθώς και μιας άλλης δερματικής διαταραχής, της ψωρίασης, και φυσιολογικά άτομα, εξετάστηκαν για την παρουσία ολικών αντισωμάτων κατά της ανθρώπινης tTG. Παρακάτω παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης των ολικών αντισωμάτων κατά της TG σε ασθενείς με ΚΚ και σε άλλους μάρτυρες νόσου. Τέσσερα φυσιολογικά άτομα που βρέθηκαν θετικά, ήταν ασθενώς θετικά.



Διάγνωση	Αρ. εξετασθέντων δειγμάτων	Αρ. θετικών δειγμάτων
Κοιλιοκάκη	94	75*
Με ανεπάρκεια σε IgA		
Κοιλιοκάκη	15	15
Χωρίς κοιλιοκάκη	13	0
Ερπητοειδής δερματίτιδα	22	14
Μάρτυρες νόσου	56	2
Φυσιολογικοί	65	4

*Τα 19 δείγματα κοιλιοκάκης που ήταν αρνητικά για την ολική tTG, εξετάστηκαν τόσο με την IgG tTG ELISA όσο και με την IgA tTG ELISA. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα 19 δείγματα ήταν αρνητικά στις δύο διαφορετικές αναλύσεις ELISA. Πιθανότατα, οι ασθενείς αυτοί ακολουθούσαν δίαιτα ελεύθερη γλουτένης.

Β. Ολικά αντισώματα κατά της ανθρώπινης tTG για ELISA έναντι αντι-ενδομυϊκών αντισωμάτων (EMA): Ένα σύνολο 200 δειγμάτων αναλύθηκαν με το kit διαλογής αντισωμάτων κατά της ανθρώπινης tTG Menarini™ και με το kit ανάλυσης EMA. Τα δύο από τα τέσσερα δείγματα που ήταν θετικά με τη μέθοδο διαλογής αντισωμάτων tTG Menarini™ και αρνητικά με την ανάλυση EMA, ήταν οροί από ασθενείς με ΕΔ και ήταν ασθενώς θετικά. Τα άλλα δύο ψευδώς θετικά δείγματα ανήκαν στην πληθυσμιακή ομάδα με νόσο φλύκταινας/πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς. Τρία από τα πέντε δείγματα που ήταν αρνητικά με το kit διαλογής αντισωμάτων tTG Menarini™ και θετικά στην ανάλυση EMA είχαν τίτλο ίσο με 10 ή μικρότερο. Τα άλλα δείγματα της υποομάδας ΚΚ είχαν τίτλο ίσο με 40 και 20, με συγκέντρωση ίση με 14,6 EU/ml και 19,8 EU/ml, αντίστοιχα.

		Αντισώματα EMA Menarini™		
		Θετικά	Αρνητικά	Σύνολο
Διαλογή αντισωμάτων αντι- hu tTG Menarini™	Θετικά	102	4	106
	Αρνητικά	5	89	94
	Σύνολο	107	93	200

Σχετική συμφωνία: 96%

Σχετική ευαισθησία: 95%

Σχετική ειδικότητα: 96%

Γ. Διασταυρούμενη αντίδραση: Αναλύθηκε ένα σύνολο 56 μαρτύρων (ασθενείς με διαταραχές συνδετικού ιστού, όπως ψωρίαση, και αυτοάνοσες φυσαλλιδώδεις-πομφολυγώδεις διαταραχές, όπως φλύκταινα και πομφολυγώδες πεμφιγοειδές). Βρέθηκαν δύο ασθενώς θετικά δείγματα.

Ακρίβεια:

Με βάση ανάλυση 10 αντιγράφων, υπολογίστηκε ο συντελεστής ποικιλότητας (CV) εντός σειράς και μεταξύ σειρών της ανάλυσης ολικών αντισωμάτων κατά της ανθρώπινης tTG με ELISA.

	Μεταξύ σειρών CV	Εντός σειράς CV
Υψηλός	5,5%	3,8%
Μέτριος	9,7%	5,8%
Χαμηλός	8,5%	6,4%
Τιμή cut-off (20 EU/ml)	11%	9%

Γραμμικότητα:

Για να προσδιοριστεί η αποδεκτή γραμμικότητα, τα πλακίδια αναλύθηκαν με βαθμονομητές που δίνουν γνωστές τιμές. Προσδιορίστηκαν οι τιμές r^2 της πρότυπης καμπύλης. Μια τιμή r^2 μεγαλύτερη από 0,95 θεωρείται αποδεκτή. Η μέση τιμή r^2 για αυτή την ανάλυση ήταν 0,9975. Καμία τιμή δεν ήταν μικρότερη από 0,9929.


Ανάκτηση:

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων IgG κατά της ανθρώπινης tTG αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις ενός άλλου θετικού δείγματος με γνωστές ποσότητες αντισωμάτων κατά της tTG. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα αντισωμάτων κατά της ανθρώπινης tTG στα αναμιχθέντα δείγματα και από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η επί τοις εκατό ανάκτηση. Τα αποτελέσματα ήταν ως εξής:

	Αντι-hu tTG Προστιθέμενη συγκ. αντισ. (EU/ml)	Αντι-hu tTG Ληφθείσα συγκ. αντισ. (EU/ml)	Ανάκτηση %
Δείγμα 1	54,1	53,7	99,4
Δείγμα 2	73,8	86,5	117,2
Δείγμα 3	89,3	106,1	118,7

Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ Menarini™ EN ΣΥΝΤΟΜΙΑ

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΤΕ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ



ΠΡΟΣΘΕΣΤΕ ΣΤΙΣ ΜΙΚΡΟΚΥΦΕΛΙΔΕΣ 100 ML ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ, ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ



ΕΠΩΑΣΤΕ ΕΠΙ 30 ΛΕΠΤΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ



ΕΚΠΛΥΝΕΤΕ ΤΟ ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4 ΦΟΡΕΣ



ΠΡΟΣΘΕΣΤΕ 100 ML ΣΥΖΕΥΚΤΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΙΣ ΜΙΚΡΟΚΥΦΕΛΙΔΕΣ.



ΕΠΩΑΣΤΕ ΕΠΙ 30 ΛΕΠΤΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ



ΕΚΠΛΥΝΕΤΕ ΤΟ ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4 ΦΟΡΕΣ



ΠΡΟΣΘΕΣΤΕ 100 ML ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΙΣ ΜΙΚΡΟΚΥΦΕΛΙΔΕΣ.



ΕΠΩΑΣΤΕ ΕΠΙ 30 ΛΕΠΤΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ



ΠΡΟΣΘΕΣΤΕ 100 ML ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΣΤΙΣ ΜΙΚΡΟΚΥΦΕΛΙΔΕΣ



ΔΙΑΒΑΣΤΕ ΤΗΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΣΤΑ 405 NM



IVD

BEIPACKTEXT

REF 38066 tTG-ELISA-Screeningstest 96 Determinations

VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von Antikörpern gegen humane Gewebetransglutaminase in Humanserum als Hilfsmittel bei der Diagnose von Zöliakie (CD) und Dermatitis herpetiformis (DH).

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Zöliakie (Celiac Disease - CD) und Dermatitis Herpetiformis sind gastrointestinale Autoimmunstörungen, die in genetisch veranlagten Personen auftreten kann und durch den Verzehr von glutenhaltigen Getreidesorten, z.B. Weizen, Gerste und Roggen, ausgelöst wird. CD ist durch Malabsorption aufgrund einer Entzündung der Dünndarmschleimhaut gekennzeichnet und kann bei längerem Andauern zu Unterernährung führen. Zu den klassischen Symptomen von CD zählen Durchfall, Gewichtsverlust und Unterernährung. Nur ein geringer Anteil der CD-Patienten zeigt jedoch die klassischen Symptome. Studien haben gezeigt, dass die Verbreitung von CD von einer Population zur anderen stark schwankt¹. Die tatsächliche Verbreitung ist nur schwer festzustellen. Wenn zur Beurteilung der Verbreitung nur klinische Kriterien herangezogen werden, ist die Häufigkeit von CD sehr viel geringer als die mit serologischen Methoden ermittelte Häufigkeit^{1,2}. Bei Anwendung von serologischen Methoden beträgt die Häufigkeit von CD in der allgemeinen Bevölkerung etwa 1 in 200. Wenn CD nicht frühzeitig diagnostiziert wird, kann dies bei der betroffenen Person langfristig zu Komplikationen wie z.B. Milzatrophy und intestinalem Lymphom führen. Eine glutenfreie Diät (GFD) normalisiert die Schleimhaut und hilft dabei, die Wahrscheinlichkeit von bösartigen Folgeerkrankungen zu verringern^{3,4}. Der Goldstandard bei der Diagnose von CD ist nach wie vor die histologische Untersuchung einer Dünndarmbiopsie, die jedoch ihre Grenzen hat. So können zum Beispiel einige Patienten mit latenter oder sogar aktiver CD eine normale Histopathologie aufweisen⁵. Der Unterschied zwischen CD und DH ist, dass Patienten neben der zugrunde liegenden Glutenenteropathie auch unter juckenden, blasenbildenden Hauterkrankungen leiden.

Die überarbeiteten Kriterien der European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) schließen im Fall einer offensichtlichen Besserung der klinischen Symptome unter GFD nur eine einzige Biopsie ein⁶. Positive Serologieergebnisse zum Zeitpunkt der Diagnose mit Rückgang unter GFD tragen zur Diagnosestellung bei. Zu den verschiedenen Tests, die bei der Untersuchung von Patienten mit Verdacht auf CD angewendet werden, zählen Tests auf Anti-Gliadin-Antikörper (AGA), Anti-Endomysium-Antikörper (EMA), Anti-Retikulin-Antikörper (ARA) und Anti-Gewebetransglutaminase-Antikörper (tTG).

Seit tTG als endomysiales Antigen identifiziert wurde, sind ELISA-Methoden zum Nachweis von Antikörpern im Serum von Patienten mit CD beschrieben worden. Der Vorteil des Anti-tTG-Antikörpertests ist, dass er automatisierbar und weniger subjektiv als der EMA-Test ist. Aus diesem Grund haben sich viele Labore für die Anwendung der tTG-Methode als Screeningtest entschieden. Verschiedene Studien zur Wirksamkeit der tTG-Antikörpermethode als Screeningtest für CD haben gezeigt, dass die Spezifität und Sensitivität dieser Methode zwischen 90 und 95% liegen⁷. Es wurde beschrieben, dass die Anwendung von Human-tTG die Sensitivität des tTG-Antikörpertests auf CD verbessert.

Die meisten Tests weisen tTG-Antikörper vom IgA-Isotyp nach. Dies schränkt die Tests ein, da bei CD-Patienten mit IgA-Mangel falsche positive Serologieergebnisse auftreten können⁸. Dies kann die Nützlichkeit von Serumantikörpermethode für den Nachweis aller Fälle von CD beeinträchtigen^{9,10}.

IgA-Mangel ist ein häufiger Immundefizit, der bei einem von 500-700 gesunden Blutspendern nachgewiesen wird¹¹⁻¹³. Um falsche negative Ergebnisse zu vermeiden, ist es notwendig, eine Methode zur Verfügung zu haben, die tTG-Antikörper gegen beide Immunglobulin-Isotypen (IgA und IgG) nachweisen kann.



TESTPRINZIP

Der Anti-hu-tTG-Gesamtantikörpertest wird als Festphasen-ELISA durchgeführt. Mikrotiterplattenvertiefungen werden mit rekombinantem hu-tTG-Antigen beschichtet. Anschließend werden die unreaktierten Stellen blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibratoren und Serumproben vom Patienten werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert; dies erlaubt die Bindung der im Serum vorhandenen Anti-tTG-Antikörper. Nicht-gebundene Antikörper und andere Serumeiweiße werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. An die Vertiefungen gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-human-Immunglobulin-Konjugats in die Vertiefungen nachgewiesen. Diese enzymkonjugierten Antikörper binden sich spezifisch an das humane Immunglobulin, das in den Vertiefungen an die tTG gebunden ist. Nicht-gebundenes Enzymkonjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antikörpern gegen hu tTG wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird 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 genehmigten 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 immer als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹⁴.

WARNUNG – Natriumazid (NaN₃) 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 A. Menarini Diagnostics S.r.l. mit derselben Bestellnummer. Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

Mitgelieferte Materialien

Menarini™ tTG-ELISA-Screeningtest REF 38066

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen



12 x 8	MICROPLATE hu-tTG	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit hu-tTG-Antigen beschichtet
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A hu-tTG Screen *	Gebrauchsfertiger Kalibrator A (<i>grüne Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen tTG.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B hu-tTG Screen *	Gebrauchsfertiger Kalibrator B (<i>lila Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen tTG.



1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C hu-tTG Screen *	Gebrauchsfertiger Kalibrator C (<i>blaue Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen tTG.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D hu-tTG Screen *	Gebrauchsfertiger Kalibrator D (<i>gelbe Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen tTG.
1 x 1,5 ml	CONTROL + hu- tTG Screen *	Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (<i>rote Kappe</i>). Enthält tTG-positives Humanserum.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (<i>weiße Kappe</i>). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	IgA/IgG-CONJ ALKPHOS *	Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Gebrauchsfertiger Serumverdünner . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Gebrauchsfertiges Enzymsubstrat . Enthält pNPP. Vor Licht schützen.
1 x 12 ml	STOP	Gebrauchsfertige Stopplösung .
2 x	BUF WASH	Waschpuffer in Pulverform . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

* Enthält <0,1% NaN₃

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

- LOT** Chargennummer
- REF** Bestellnummer
-  Verwendbar bis
-  Lagerungstemperatur
-  Gebrauchsanleitung lesen
- IVD** In-vitro-Diagnostikum
-  Hersteller
-  Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähiges Papier
- 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.
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl.



Andere erhältliche serologische Tests als Hilfsmittel bei der Diagnose von CD

Menarini™ Test für anti-endomysiale Antikörper (distaler Primatenösophagus) (6 Objektträger mit je 8 Vertiefungen)	REF 38060
Menarini™ Test für anti-endomysiale Antikörper (glatter Primatenmuskel) (8 Objektträger mit je 6 Vertiefungen)	REF 37790
Menarini™ IgA-Anti-Gliadin-Antikörper-ELISA (AGA)	REF 37789
Menarini™ IgG-Anti-Gliadin-Antikörper-ELISA (AGA)	REF 37809
Menarini™ Anti-Gliadin-Antikörper-ELISA-Screeningtest (AGA)	REF 37979
Menarini™ IgA-Anti-hu-tTG-Antikörper-ELISA	REF 37795
Menarini™ IgG-Anti-hu-tTG-Antikörper-ELISA	REF 37796

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.

- Warten Sie vor Beginn des Testverfahrens mindestens 30 Minuten, bis die Serumproben und Testreagenzien Raumtemperatur erreicht haben. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.
- Eine gute Waschmethode ist unerlässlich. Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschlösung über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.

Testmethode

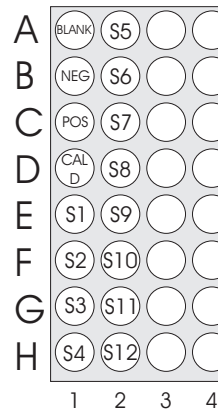
Schritt 1 Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.

Schritt 2 Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.

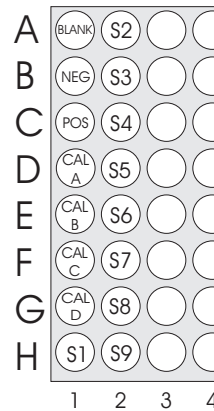
Schritt 3 Verwenden Sie für eine **qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen niedrigen Kalibrator D (*Fläschchen mit gelber Kappe*).

oder Verwenden Sie für eine **semi-quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis D, wie in der Probenanordnung unten angezeigt.

QUALITATIVE BESTIMMUNG



SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG



- Schritt 4** Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:51**, indem Sie **10 µl** der Patientenprobe mit **0,5 ml** Serumverdünner vermischen.
- Schritt 5** Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen 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 gegen Luft abgelesene Extinktion der Blindprobe sollte nicht über 0,3 liegen.
- Schritt 6** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 7** Waschen Sie **4x** mit Waschpuffer. Wenn Sie manuell waschen, füllen Sie jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.
- Schritt 8** Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.
- Schritt 9** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 10** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 7 beschrieben.
- Schritt 11** Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.
- Schritt 12** Inkubieren Sie die Mikrotitervertiefungen **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 13** Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie den Extinktionswert innerhalb 1 Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.
- Schritt 14** Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **405 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 405/630 nm.

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

Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse sollten als positiv oder negativ angegeben werden.

Ext. der Testprobe

----- X EU/ml von Kalibrator D = EU/ml Testprobe

Ext. von Kalibrator D

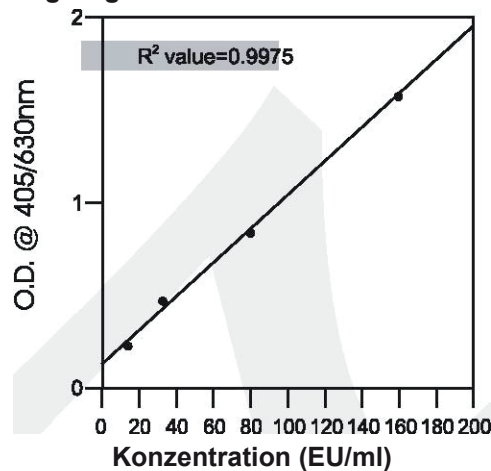
2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

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

Menarini™ IgA-/IgG-Gesamt-Anti-hu-tTG Standardkurve



Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborergebnisse. Diese Werte wurden bestimmt, indem 113 normale erwachsene Blutspender getestet wurden. Die unten angezeigten Werte sind



der Mittelwert der normalen Testpersonen plus 3 Standardabweichungen. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen.

Anti-hu-tTG-Wert	Interpretation
< 20 EU/ml	negativ
20-25 EU/ml	unbestimmt (Grenzbereich)
> 25 EU/ml	positiv

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Der Menarini™ Anti-hu-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.

ERWARTETE WERTE

Der erwartete Wert in einer normalen Bevölkerung ist negativ (<20 EU/ml). Bei Patienten mit CD wurde das Auftreten von IgA-Anti-tTG-Antikörpern bei 82-100% der Patienten mit aktiver CD beschrieben, mit einer Sensitivität von 76-99%¹⁵. Wie von Seissler et al beschrieben, erbrachte der kombinierte Nachweis von IgG- und IgA-Anti-tTG-Antikörpern eine Sensitivität von 95% mit einer Spezifität von 99%¹⁶. 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 und können positiv werden, wenn CD-Patienten, die sich bisher glutenfrei ernährt haben, glutenhaltige Nahrung aufnehmen¹⁷⁻²¹.

LEISTUNGSMERKMALE

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

- a) Klinische Befunde
- b) Vergleich mit endomysialen Antikörpern (EMA)

Normalbereich: Der Normalbereich wurde bestimmt, indem 65 vom Roten Kreuz erhaltene Serumproben von anscheinend gesunden Spendern getestet wurden. Der Mittelwert plus drei Standardabweichungen vom Mittelwert dieser normalen Bevölkerung wurde verwendet, um die Trennlinie zwischen normalen und grenzwertig positiven Personen festzulegen.

Vergleichende Spezifität und Sensitivität

A. Klinische Korrelation: Insgesamt 200 Serumproben von CD-Patienten mit und ohne IgA-Mangel, von verschiedenen Krankheitskontrollseren, einschließlich Seren von Patienten mit einer klinischen Diagnose der blasenbildenden Krankheiten Pemphigus, Pemphigoid und einer anderen Hautkrankheit, Psoriasis, sowie von normalen Testpersonen wurden auf Gesamt-Anti-hu-tTG-Antikörper hin untersucht. Bei CD und bei den anderen Krankheitskontrollseren traten Gesamt-Anti-hu-tTG-Antikörpern mit folgender Häufigkeit auf: Bei vier normalen Patienten war der Befund schwach positiv.

Diagnose	getestet	positiv
Zöliakie	94	75*
IgA-Mangel		
mit Zöliakie	15	15
ohne Zöliakie	13	0
Dermatitis herpetiformis	22	14
Krankheitskontrollseren	56	2
Normal	65	4



*Die 19 Zöliakieproben, die für Gesamt-tTG negativ waren, wurden sowohl mit dem IgG-tTG-ELISA als auch mit dem IgA-tTG-ELISA getestet. In allen 19 Fällen waren die Proben mit zwei verschiedenen ELISA-Tests negativ. Diese Patienten befolgten höchstwahrscheinlich eine glutenfreie Diät.

B. Gesamt-Anti-hu-tTG-ELISA gegen endomysiale Antikörper (EMA): Insgesamt 200 Proben wurden mit dem Menarini™ Gesamt-Anti-hu-tTG-Antikörperkit und mit einem EMA-Testkit getestet. Zwei der vier Proben, die mit dem Menarini Gesamt-tTG-Test positiv und mit dem EMA-Test negativ waren, waren von Patienten mit DH und waren schwach positiv. Die beiden anderen falsch positiven Proben waren aus der Patientengruppe mit Pemphigus/Pemphigoid. Drei der fünf Proben, die mit dem Menarini Gesamt-tTG-Test negativ und mit dem EMA-Test positiv waren, hatten Titer von 10 oder weniger. Die anderen Proben in der CD-Untergruppe hatten Titer von 40 und 20, mit Ergebnissen von 14,6 EU/ml bzw. 19,8 EU/ml.

Menarini™		Menarini™ EMA		Gesamt
		Positiv	Negativ	
	Positiv	102	4	106
	Negativ	5	89	94
	Gesamt	107	93	200

Relative Übereinstimmung: 96%

Relative Sensitivität: 95%

Relative Spezifität: 96%

C. Kreuzreaktivität: Insgesamt 56 Kontrollseren (Patienten mit Bindegewebskrankheiten wie Psoriasis, autoimmunen blasenbildenden Krankheiten wie Pemphigus und Pemphigoid) wurden getestet. Zwei von diesen waren schwach positiv.

Genauigkeit:

Auf der Grundlage von 10 Wiederholungen wurden der intraserielle und der interserielle Variationskoeffizient (VK) des Gesamt-Anti-hu-tTG-ELISA berechnet.

	interserieller VK	intraserieller VK
Hoch	5.5%	3.8%
Mittel	9.7%	5.8%
Niedrig	8.5%	6.4%
Grenzwert (20 EU/ml)	11%	9%

Linearität:

Um die akzeptable Linearität zu bestimmen, wurden Platten mit Kalibratoren mit bekannten Werten getestet. Es wurden die r^2 -Werte der Standardkurve bestimmt. Ein r^2 -Wert über 0,95 wird als akzeptabel angesehen. Der mittlere r^2 -Wert dieses Tests lag bei 0,9975. Kein Wert lag unter 0,9929.

Wiederfindung:

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

	Anti-hu-tTG AK-Konz. zugefügt (EU/ml)	Anti-hu-tTG AK-Konz. gemessen (EU/ml)	% Wiederfindung
Probe 1	54.1	53.7	99.4
Probe 2	73.8	86.5	117.2
Probe 3	89.3	106.1	118.7

**MENARINI™ VERFAHREN AUF EINEN BLICK**

PROBENVERDÜNNUNGEN VORBEREITEN

100 ML DER PROBEN, KALIBRATOREN UND KONTROLLSEREN
IN DIE MIKROTITERVERTIEFUNGEN PIPETTIEREN

30 MINUTEN BEI RAUMTEMPERATUR INKUBIEREN



MIKROTITERPLATTE 4X WASCHEN

100 ML KONJUGAT IN DIE MIKROTITERVERTIEFUNGEN PIPETTIEREN



30 MINUTEN BEI RAUMTEMPERATUR INKUBIEREN



MIKROTITERPLATTE 4X WASCHEN



100 ML ENZYMSUBSTRAT IN DIE MIKROTITERVERTIEFUNGEN PIPETTIEREN



30 MINUTEN BEI RAUMTEMPERATUR INKUBIEREN



100 ML STOPPLÖSUNG IN DIE MIKROTITERVERTIEFUNGEN PIPETTIEREN



EXTINKTION BEI 405 NM ABLESEN



Anti-Transglutaminase de Tissu humain (hutTG) IgG/IgA ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 38066 Screen tTG ELISA 96 Tests

Menarini™ anti-tTG IgG/IgA est un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection et la semi-quantification des anticorps hutTG dans le sérum humain. La présence de ces anticorps constitue une aide précieuse pour le diagnostic de la maladie coeliaque (CD) et de la dermatite herpétiforme (DH).

GENERALITES

La maladie coeliaque (CD) et la dermatite herpétiforme (DH) sont des désordres gastro-intestinaux auto-immunitaires qui peuvent se produire chez des individus génétiquement susceptibles suite à l'ingestion d'aliments contenant du gluten tels que le blé, l'orge et le seigle.

Le CD est caractérisé par un défaut d'absorption résultant de dommages inflammatoires au niveau de la muqueuse intestinale qui, s'il se prolonge, peut causer une malnutrition. Les symptômes classiques du CD sont la diarrhée, la perte de poids et la malnutrition.

Seulement un petit pourcentage des patients présentant le CD développe des symptômes classiques. Les études ont révélé que la prédominance du CD peut être fortement variable de population en population¹. Il a été difficile d'établir la vraie prévalence. Les critères disparates utilisés dans le diagnostic du CD en sont souvent la cause. Si seuls des critères cliniques sont employés pour déterminer la prévalence, l'incidence du CD est beaucoup plus limitée par rapport à l'incidence établie par des méthodes sérologiques^{1,2}. Avec les méthodes sérologiques employées, l'incidence du CD dans la population générale est approximativement de une sur 200. L'absence de diagnostic précoce de CD peut entraîner des complications à long terme chez le patient telles que l'atrophie splénique et le lymphome intestinal. Un régime sans gluten (GFD) normalise la muqueuse et aide à réduire la malignité potentielle^{3,4}. L'examen histologique de la biopsie du petit intestin demeure le meilleur moyen pour diagnostiquer le CD, mais il a ses propres limites également. Par exemple, certains patients ayant une forme latente ou même active de CD peuvent avoir une histopathologie normale⁵. La DH se différencie du CD car les patients souffrant de DH présentent des désordres de la peau tels le prurit, les démangeaisons et désordres vésiculo-bulbeux en plus de l'entéropathie liée au gluten.

Les nouveaux critères de l'European Society Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGHAN) incluent uniquement une biopsie simple avec une nette diminution des symptômes cliniques lors d'une alimentation sans gluten⁶. Une sérologie positive au moment du diagnostic lors de régime incluant le gluten contribue au diagnostic. Les divers tests sérologiques utilisés chez les patients présentant un risque de CD, comprennent également les anticorps anti-gliadine (AGA), les anticorps anti-périmysiaux (EMA), les anticorps anti-réticuline (ARA) et les anticorps anti-tissu transglutaminase (tTG).

Depuis l'identification du tTG comme antigène endomysial, des méthodes d'ELISA ont été décrites pour détecter des anticorps dans les sérums des patients présentant le CD. L'avantage de l'analyse d'anticorps anti-tTG est qu'il est automatisable et moins subjective que l'EMA. Pour cette raison, beaucoup de laboratoires ont choisi d'employer la méthode d'anticorps tTG comme méthode de détection. Dans ces laboratoires, ce peut être la seule analyse utilisée pour la détection des cas de CD. Dans diverses études sur l'efficacité de la méthode d'anticorps tTG pour détecter le CD, la spécificité et la sensibilité de cette méthode s'est avérée être de 90% à 95%⁷. Il a été observé que le tTG humain s'est avéré augmenter la sensibilité de l'analyse d'anticorps tTG pour le CD.

La plupart des tests détectent les anticorps au tTG de l'isotype IgA. Ceci présente quelques limitations car les patients souffrant de CD et IgA déficients peuvent avoir des sérologies faussement négatives⁸. Ceci peut compromettre l'utilité d'une méthode de détection basée sur les anticorps sériques pour tous les cas de CD^{9,10}. La déficience en IgA est une déficience immunitaire commune retrouvée dans le sang de 500 à 700 donneurs en bonne santé¹¹⁻¹³. Pour prévenir les faux négatifs, il est nécessaire d'utiliser une méthode qui peut détecter les anticorps des deux isotopes d'immunoglobulines tTG (IgA et IgG).



PRINCIPES DU TEST

L'antigène tTG recombinant est fixé sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène et, ensuite, les sites n'ayant pas réagi sont bloqués pour réduire l'attache non spécifique. Les contrôles, les étalons et les sérums de patients dilués sont ajoutés dans différents puits, autorisant chaque anticorps tTG présent à se lier à l'antigène en place. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique anti- Ig humaine est alors ajouté dans chaque puit pour révéler les anticorps du patient. Ces anticorps se lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine. Après une étape d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat enzymatique (pNPP) suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Après avoir arrêté la production enzymatique de produit coloré, la présence ou l'absence d'anticorps anti-tTG sera déterminée par lecture au spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA par millilitres (EU/ml).

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs du coffret entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.** Ne pas employer le réactif si il est trouble ou si un précipité s'est formé. Tous les réactifs doivent être portés à la température ambiante (20-25°C) avant de les utiliser. Le tampon de lavage est stable jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes. Reconstituer le tampon de lavage en y ajoutant de l'eau distillée ou déionisée pour un volume de 1 L. Les micropuits ne peuvent être utilisés qu'une seule fois.

Précautions

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage¹⁴.

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN₃). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.

Respecter les techniques de laboratoire réduisant au minimum la contamination microbienne et chimique. Ne pas employer après la date d'échéance.

Matériel fourni

Menarini™ Screen tTG ELISA **REF** 38066

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun









12 x 8	MICROPLATE hu-tTG	Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène hu tTG.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A hu-tTG Screen *	Etalon A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps aux tTG.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B hu-tTG Screen *	Etalon B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps aux tTG.



1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C hu-tTG Screen *	Étalon C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps aux tTG.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D hu-tTG Screen *	Étalon D (<i>couvercle jaune</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps aux tTG.
1 x 1,5 ml	CONTROL + hu- tTG Screen *	Contrôle positif (<i>couvercle rouge</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain positif anticorps aux tTG.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Contrôle négatif (<i>couvercle blanc</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	IgA/IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines. Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL *	Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. Protéger de la lumière.
1 x 12 ml	STOP	Solution d'arrêt prête à l'emploi.
2 x	BUF WASH	Tampon de lavage en poudre. Reconstituer pour 1 litre/ flacon.

* Contient < 0.1% NaN₃

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

- Eau distillée ou déionisée
- Bouteille pour le tampon de lavage
- Pipettes de 5 à 1000 µl
- Bouts de pipette jetables
- Petits tubes (ex : 12 X 75 mm) et porte-tubes
- Timer
- Papier absorbant
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm. Si la longueur d'onde double est disponible, le filtre de référence sera de 600-650 nm.
- Bac pour le lavage automatique capable de dispenser 200 µl



Autres tests sérologiques disponibles pour l'aide au diagnostic du CD

Test Menarini™ de détection des Anticorps Anti-endomysiaux (Oesophage distal de singe) (6 lames 8 puits)	REF 38060
Test Menarini™ de détection des Anticorps Anti-endomysiaux (Muscle lisse de singe) (8 lames 6 puits)	REF 37790
Menarini™ anticorps anti-gliadine (AGA) IgA ELISA	REF 37789
Menarini™ anticorps anti-gliadine (AGA) IgG ELISA	REF 37809
Menarini™ anticorps anti-gliadine (AGA) Screen ELISA	REF 37979
Menarini™ anticorps anti-hu tTG IgA ELISA	REF 37795
Menarini™ anticorps anti-hu tTG IgG ELISA	REF 37796

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

METHODE

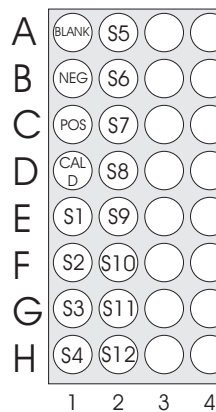
Préparation du test

- Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante pendant 30 minutes avant de les utiliser. Replacer les produits au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- Lavage: il est important d'utiliser une bonne technique. Si l'opération est réalisée manuellement, diriger un jet puissant de vapeur de tampon de lavage à l'aide d'une large bouteille sur toute la superficie de la micro-lamelle. **Il est recommandé d'utiliser un bac de lavage des micro-lamelles automatique.**
- Utiliser une pipette multicanaux capable de remplir 8 puits simultanément. Ceci rend le processus plus rapide et fournit un temps d'incubation plus uniforme.
- La synchronisation est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution des réactifs.
- L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit être réalisé à la même cadence et selon la même séquence.
- Remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient contenant le dessiccateur, refermer hermétiquement pour minimiser toute exposition à l'humidité. Replacer immédiatement les lamelles au réfrigérateur.

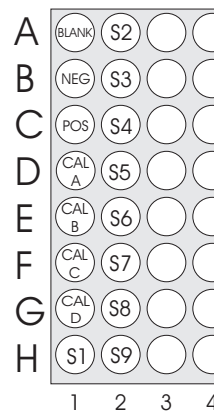
Exécution du test

1. Porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante.
2. Indiquer sur une feuille du protocole la position des échantillons sur la micro-lamelle. Il est de bonne pratique de vérifier les échantillons en double.
3. **Détermination qualitative** : employer uniquement l'étalon D (*couvercle jaune*).
Détermination semi-quantitative : employer étalons A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.

DÉTERMINATION QUALITATIVE



DÉTERMINATION SEMI-QUANTITATIVE



4. Préparer une dilution de **1:51** de l'échantillon patient en mélangeant **10 µl** de l'échantillon patient à **0.5 ml** de diluant pour échantillons.
5. Ajouter **100 µl** des étalons, des échantillons de patients dilués, des contrôles négatif et positif dans les puits indiqués sur la feuille de protocole.
Note : Inclure un puit avec **100 µl** de diluant pour échantillons comme blanco de réactif. La lecture ELISA de ce blanco devrait être nulle. L'absorbance de ce micropuit ne devra pas dépasser 0.3.
6. Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 minutes) à température ambiante.
7. Laver **4 x** avec le tampon de lavage: aspirer soigneusement le contenu de chaque puit. Ajouter le tampon reconstitué dans tous les puits et aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération trois fois supplémentaires pour un total de quatre lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant pour enlever tout liquide de lavage résiduel. En cas d'utilisation de bacs de lavage automatiques, programmer l'appareil comme indiqué sur la notice d'utilisation.
8. Ajouter **100 µl** de conjugué dans chaque puit.
9. Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 min.) à température ambiante.
10. Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 7.
11. Ajouter **100 µl** de substrat enzymatique dans chaque puit.
12. Laisser incuber **30 minutes** (+- 5 min.) à température ambiante.
13. Ajouter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puit. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du substrat enzymatique. Lire la densité optique (D.O.) dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.
14. Lire la densité optique (D.O.) de chaque puit à **405nm** en utilisant un lecteur simple ou à longueur d'onde double en prenant le blanco de réactif comme référence de D.O. nulle.

Contrôle qualité

Les étalons, les contrôles positifs et négatifs et un blanco doivent être présents dans chaque série de test pour garantir l'intégrité et la précision de ce dernier. La lecture de densité optique du blanco doit être inférieure à 0.3. L'étalon A doit avoir une lecture de densité optique supérieure à 1.0, sinon le test doit être répété. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est réalisé en double, prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer les concentrations en anticorps anti-hu tTG. Lors des déterminations qualitatives, la densité optique de l'étalon D doit être plus grande que celle du contrôle négatif et plus petite que celle du contrôle positif. Pour les déterminations semi-quantitatives, le contrôle positif doit donner des valeurs dans les fourchettes figurant sur le flacon. Nous recommandons de tester les échantillons à la limite de péremption avec des échantillons frais prélevés plus tard pour assurer la précision.



RESULTATS

Calcul des résultats

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

1. DETERMINATION QUALITATIVE

Les résultats obtenus par cette méthode seront reportés comme négatifs ou positifs.

D.O. Echantillon

----- X EU/ml étalon D = EU/ml Echantillon

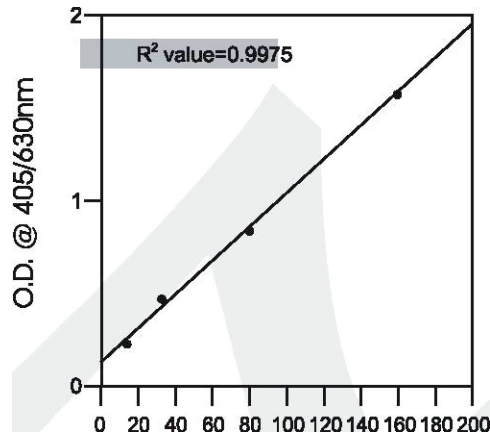
D.O. Etalon D

2. DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Tracer l'absorbance des étalons A à D par rapport leur concentration respective sur un graphique linéaire. Tracer la concentration en EU / ml sur l'axe des X et l'absorbance sur l'axe Y et dessiner la courbe la plus proche. Déterminer les concentrations des échantillons patients provenant de la courbe par leurs valeurs correspondantes d'absorbance.

Etalons

Les étalons sont fournis pour une détermination semi-quantitative et doivent être employés lors de chaque test. Les échantillons patients contenant les niveaux les plus élevés d'anticorps peuvent donner des valeurs d'absorbance plus grandes que celles de l'étalon A. Pour la détermination des valeurs semi-quantitatives précises de tels échantillons, il faut les diluer et les retester jusqu'à ce que les résultats puissent être lus sur la courbe d'étalonnage. Pour la détermination en EU / ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.



Interprétation

L'information suivante sert seulement de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire. Ces valeurs ont été déterminées en testant 113 échantillons de sang de donneurs adultes. Les valeurs indiquées ci-dessous sont la moyenne des sujets plus déviation standard de 3. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Valeurs Anti-hu tTG	Interprétation
<20 EU/ml	Négatif (-)
20 – 25 EU/m	Indéterminé
>25 EU/ml	Positif (+)



LIMITES D'UTILISATION

Il est recommandé de ne pas réaliser le test Menarini™ anti-hu tTG avec des échantillons fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne. Le test doit être réalisé sur des sérums humains uniquement. Les résultats obtenus servent seulement d'aide dans le diagnostic et ne devraient pas être interprétés en tant que diagnostic à part entière.

VALEURS PREVUES

Les valeurs prévues dans une population normale sont négatives (< 20 EU/ml). Chez les patients souffrant de CD, l'incidence des anticorps anti-hu tTG IgA est de 82 à 100% des patients avec CD active avec une spécificité de 76 à 99%¹⁵. Des détections combinées d'anti-tTG IgA et IgG ont été décrites par Seissier et ses collaborateurs comme donnant une sensibilité de 95% et une spécificité de 99%¹⁶.

L'incidence et les niveaux des anticorps anti-tTG dépendent du type de régime. Les niveaux de ces anticorps diminuent et peuvent même devenir négatifs chez les patients présentant le CD et suivant un régime sans gluten. De même, les niveaux de ces anticorps augmenteront ou deviendront positifs quand les patients présentant le CD qui suivaient un régime sans gluten ingèrent un aliment en contenant 17-21.

PERFORMANCES

L'utilité du test Menarini™ anti-hu tTG total ELISA a été déterminée en comparant les résultats à :

- des facteurs cliniques ;
- à la méthode anti-endomysiale (EMA).

Gamme Normale : La gamme normale a été établie en testant 65 échantillons de sérum provenant de donneurs apparemment en bonne santé provenant de la Croix Rouge. La limite des valeurs a été déterminée en calculant la valeur moyenne + 3 STD de ces échantillons.

Comparaison spécificité et sensibilité

A. Corrélation clinique : Un total de 200 échantillons obtenus de patients souffrant de CD avec et sans déficience en IgA ; divers contrôles de maladie incluant des sérums de patients avec diagnostic clinique de pemphigus, et d'autres désordres dermatologiques, psoriasis ; et des sujets normaux ont été examinés pour les anti-hu tTG totaux. Quatre sujets normaux trouvés positifs étaient légèrement positifs.

Diagnostic	N° testés	N° Positifs
Maladie coeliaque	94	75*
Déficience IgA – Coeliaque	15	15
Déficience IgA – Non-coeliaque	13	0
Dermatite herpétiforme	22	14
Maladies contrôle	56	2
Normal	65	4

* Les 19 échantillons coeliaques qui étaient négatifs pour les tTG totaux on été testés sur ELISA tTG IgG et ELISA tTG IgA. Dans tous les cas, 19 échantillons étaient négatifs sur les deux tests ELISA. Très probablement, ces patients suivaient un régime sans gluten.

B. Menarini™ anti-hu tTG totaux ELISA contre anti-endomysiaux (EMA): Un total de 200 échantillons ont été examinés sur un kit anticorps Menarini™ anti-hu tTG totaux et un kit EMA. Deux des quatre échantillons positifs sur le test total et négatifs pour le test EMA étaient des sérums de patients souffrant de dermatite herpétiforme et étaient légèrement positifs. Les deux autres faux positifs avaient été prélevés dans une population atteinte de Pemphigus. Trois titres de 10 ou moins. Les autres échantillons de la population CD avaient des titres compris entre 40 et 20 avec des résultats respectifs de 14.6 EU/ml et 19.8 EU/ml.



		Menarini™ EMA		
		Positif	Négatif	Total
Menarini™ anti-hu tTG tot	Positif	102	4	106
	Négatif	5	89	94
	Total	107	93	200

Concordance : 96%

Sensibilité : 95%

Spécificité : 96%

C. Réactivité Croisée : Un total de 56 contrôles (patients avec désordres des tissus conjonctifs tels que le psoriasis et désordres auto-immunitaires bulbeux tels que le pemphigus) ont été réalisés. Deux ont été trouvés positifs.

Précision :

Les coefficients de variation intra et inter-test (CV) de l'ELISA anti-hu tTG totaux ont été calculés sur base de 10 répétitions.

	CV Inter-test (%)	CV Intra-test (%)
Haut	5,5	3,8
Moyen	9,7	5,8
Bas	8,5	6,4
Limite (20EU/ml)	11	9

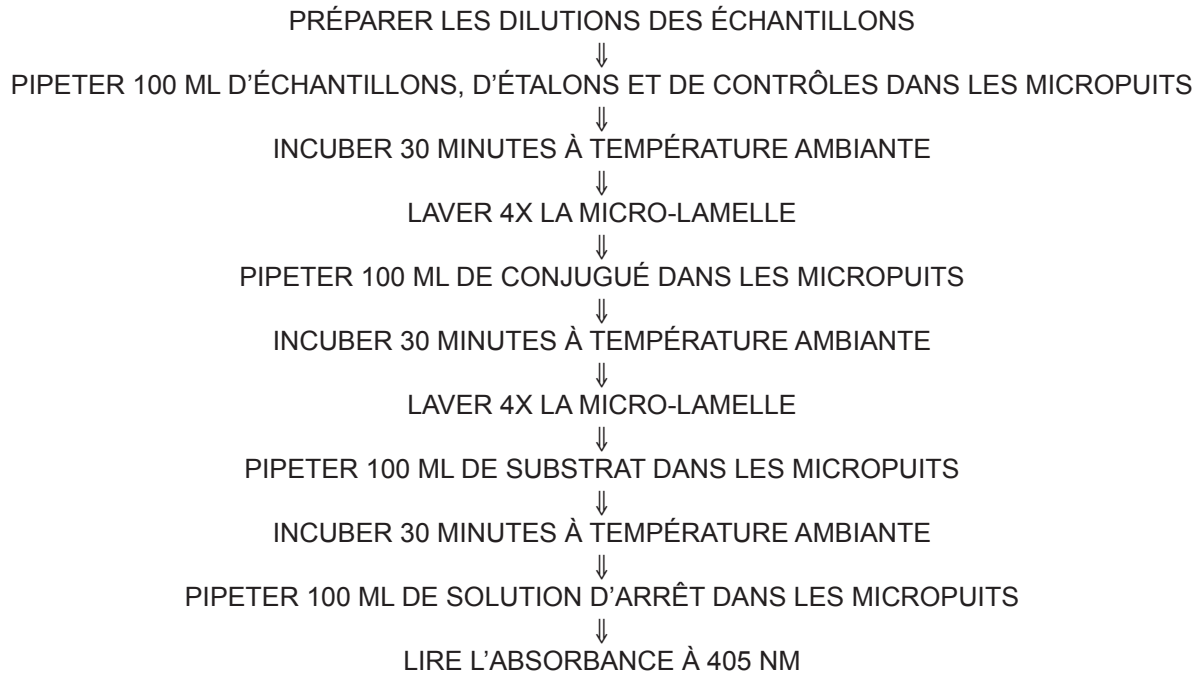
Linéarité :

Pour déterminer l'acceptabilité de linéarité, des lamelles ont été testées avec des étalons de valeurs connues. Les valeurs r^2 de la courbe standard ont été déterminées. Une valeur r^2 plus grande que 0.95 est considérée comme acceptable. La valeur moyenne r^2 de ce test est 0.9975. Il n'y a pas de valeurs inférieures à 0.9929.

Récupération

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

	Anti-hu tTG conc. ajoutée (EU/ml)	Anti-hu tTG conc. obtenue (EU/ml)	% Récupération
Echantillon 1	54,1	53,7	99,4
Echantillon 2	73,8	86,5	117,2
Echantillon 3	89,3	106,1	118,7

**PROCÉDURE MENARINI™ EN BREF**



IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 38066 ELISA para Despiste de Anticorpos Anti-tTG 96 Determinações

APLICAÇÃO

Um teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) para detecção e semiquantificação de anticorpos anti-transglutaminase tissular humana em soro humano para ajudar no diagnóstico de doença celíaca (DC) e dermatite herpetiforme (DH).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A doença celíaca e a dermatite herpetiforme são doenças gastrointestinais auto-imunes que podem ocorrer em indivíduos geneticamente susceptíveis e que são desencadeadas pela ingestão de cereais como trigo, cevada e centeio. A doença celíaca caracteriza-se por má absorção resultante de lesões Inflamatórias na mucosa do intestino delgado e, quando prolongada, pode provocar malnutrição. Os sintomas clássicos incluem diarreia, perda de peso e malnutrição. Contudo, apenas uma pequena percentagem de doentes com doença celíaca apresenta os sintomas clássicos. Foi descoberto em estudos que a prevalência de doença celíaca é altamente variável de população para população¹. Tem sido difícil comprovar a verdadeira prevalência. Se, na determinação da prevalência, forem exclusivamente utilizados critérios clínicos, a incidência de doença celíaca é muito mais baixa do que a incidência estabelecida por métodos serológicos^{1,2}. Com os métodos serológicos a incidência na população geral é de aproximadamente 1 em cada 200 pessoas.

A falha no diagnóstico precoce de doença celíaca pode predispor as pessoas afectadas a complicações a longo prazo, tais como atrofia esplénica e linfoma intestinal. Uma dieta sem glúten (DSG) normaliza a mucosa e ajuda a reduzir a probabilidade de ocorrência de tumores malignos^{3,4}. O exame histológico de biopsias do intestino delgado continua a ser o método de eleição para o diagnóstico de doença celíaca, embora também tenha as suas limitações. Por exemplo, alguns doentes com doença celíaca latente ou mesmo activa podem ter exames histopatológicos normais⁵. A dermatite herpetiforme diferencia-se da doença celíaca pelo facto de os doentes com dermatite herpetiforme apresentarem alterações vesiculo-bolhosas da pele, que provocam prurido da pele, além de terem também a enteropatia por glúten subjacente.

Os critérios revistos da Sociedade Europeia de Gastreenterologia e Nutrição Pediátrica (European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition — ESPGAN) incluem apenas uma única biopsia com remissão inequívoca dos sintomas clínicos quando os doentes fazem uma dieta sem glúten⁶. A serologia positiva na altura em que é diagnosticada a doença com desaparecimento com dieta sem glúten contribui igualmente para o diagnóstico. Os vários testes serológicos empregues na avaliação dos doentes com suspeita de doença celíaca incluem testes de anticorpos anti-gliadina (AGA), anticorpos anti-endomísio (EMA), anticorpos anti-reticulina (ARA) e anticorpos anti-transglutaminase tissular (tTG).

Desde a identificação da tTG como um antígeno endomisial, têm sido descritos métodos de ELISA para detecção de anticorpos em soros de doentes com doença celíaca. A vantagem do ensaio de anticorpos anti-tTG é que é possível de automatizar e menos subjectivo do que EMA. Por este motivo, muitos laboratórios optaram por utilizar o método dos anticorpos anti-tTG como ensaio de despiste da doença. Em vários estudos realizados sobre a eficácia do método de anticorpos anti-tTG para despiste de doença celíaca, verificou-se que a especificidade e sensibilidade deste método variam de 90 a 95%⁷. Foi descrito que as tTG humanas melhoram a sensibilidade do ensaio de anticorpos anti-tTG para a doença celíaca.

A maior parte dos ensaios detecta anticorpos anti-tTG pertencentes ao isótipo IgA. Isto traz algumas limitações, uma vez que os doentes com doença celíaca com deficiência de IgA podem produzir resultados serológicos falsos negativos⁸. Isto pode comprometer a utilidade dos métodos de anticorpos séricos na detecção de todos os casos de doença celíaca^{9,10}. A deficiência de IgA é uma imunodeficiência comum, que se encontra em cada 1 em 500-700¹¹⁻¹³ dadores de sangue saudáveis. Para evitar resultados falsos negativos e necessário ter um método que



consiga detectar anticorpos contra ambos os isótipos de imunoglobulinas (IgA e IgG) de tTG.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste de anticorpos totais anti-tTG humana é realizado como um imunoensaio em fase sólida (ELISA). Os micropoços são revestidos com antigénio de tTG humana seguido pelo bloqueio dos locais não reactivos, visando reduzir a ligação não específica. Os controlos, calibradores e amostras de soros de doentes são incubados nos poços revestidos com antigénio, o que permite a ligação dos anticorpos anti-tTG presentes no soro. Os anticorpos não ligados e outras proteínas séricas são removidos por lavagem dos micropoços. Os anticorpos ligados aos micropoços são detectados através da adição aos poços de conjugados de imunoglobulinas anti-humanas polivalentes marcados com enzima. Estes anticorpos conjugados com enzima ligam-se especificamente à imunoglobulina humana que está ligada à tTG nos micropoços. O conjugado enzimático não ligado é removido por lavagem. Em seguida, é adicionado aos poços substrato enzimático específico (pNPP), sendo a presença de anticorpos anti-tTG humana detectada por uma mudança de cor produzida pela conversão do substrato pNPP. A reacção é interrompida e a intensidade da mudança de cor, proporcional à concentração de anticorpos, é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são expressos em unidades ELISA por mililitro (UE/ml).

REAGENTES

Conservação e preparação

Conserve todos os reagentes a uma temperatura entre 2 e 8 °C. **Não congele.** Não utilize se o reagente não estiver límpido ou se existir algum precipitado. Todos os reagentes têm de estar à temperatura ambiente (20-25 °C) antes de serem utilizados. Desde que conservado a uma temperatura entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído mantém-se estável até ao fim do prazo de validade do kit. Reconstitua o tampão de lavagem com 1 l de água destilada ou desionizada. As tiras de micropoços revestidas destinam-se a ser utilizadas uma única vez.

Precauções

Para diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes obtidos a partir de seres humanos foram testados relativamente à presença de HBsAg, VHC, VIH-1, VIH-2 e HTLV-I, tendo-se obtido resultados negativos em testes reconhecidos pela FDA. Porém, os derivados de sangue humano e as amostras de doentes devem ser sempre considerados como potencialmente infecciosos. Siga as boas práticas de laboratório em relação à conservação, distribuição e eliminação destes materiais¹⁴.

ADVERTÊNCIA — A azida de sódio (NaN₃) pode reagir com a canalização de cobre e chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Elimine os líquidos com um grande volume de água para impedir a acumulação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica por ingestão. Em caso de ingestão, avise imediatamente o director do laboratório ou o centro anti-venenos.

Para garantir resultados válidos deve seguir-se com rigor as instruções descritas neste folheto informativo do kit. Não troque componentes do kit por componentes de outra origem que não tenham o mesmo número de lote da A. Menarini Diagnostics S.r.l.. Siga boas práticas de laboratório para minimizar a contaminação microbiana e a contaminação cruzada dos reagentes durante o manuseamento. Não utilize para além do fim do prazo de validade indicado no rótulo.

Materiais fornecidos

ELISA para Despiste de Anticorpos Anti-tTG Menarini™ **REF** 38066

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8

MICROPLATE hu-tTG

Microplaca com micropoços individuais destacáveis revestidos com antigénio hu tTG.

1 x 1,5 ml

CALIBRATOR A hu-tTG Screen *






Calibrador A pronto a usar (*tampa verde*). Soro humano contendo anticorpos anti-tTG.



1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B hu-tTG Screen *	Calibrador B pronto a usar (tampa violeta). Soro humano contendo anticorpos anti-tTG.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C hu-tTG Screen *	Calibrador C pronto a usar (tampa azul). Soro humano contendo anticorpos anti-tTG.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D hu-tTG Screen *	Calibrador D pronto a usar (tampa amarela). Soro humano contendo anticorpos anti-tTG.
1 x 1,5 ml	CONTROL + hu- tTG Screen *	Controlo positivo pronto a usar (tampa vermelha). Contém soro humano positivo para anticorpos anti-tTG.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo pronto a usar (tampa branca). Contém soro humano.
1 x 12 ml	IgA/IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz.
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% NaN₃

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

- Água desionizada ou destilada
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Pipetas com capacidade para distribuir 5 a 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis
- Tubos de ensaio de 12 x 75 mm, limpos, e respectivo suporte
- Temporizador



- Papel absorvente
- Leitor de microplacas com capacidade para leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver disponível um leitor de microplacas com duplo comprimento de onda, o filtro de referência deve ser definido para 600–650 nm.
- Dispositivo automático de lavagem de micropipetas com capacidade para distribuir 200 µl

OUTROS TESTES SEROLÓGICOS DISPONÍVEIS COMO AUXILIARES DO DIAGNÓSTICO DE DOENÇA CELÍACA

Teste de anticorpos anti-endomisiais Menarini™ (esófago distal de primata) (6 lâminas de 8 poços)	REF	38060
Teste de anticorpos anti-endomisiais Menarini™ (músculo liso de primata) (8 lâminas de 6 poços)	REF	37790
ELISA para anticorpo IgA anti-gliadina (AGA) Menarini™	REF	37789
ELISA para anticorpo IgG anti-gliadina (AGA) Menarini™	REF	37809
ELISA para despiste de anticorpo anti-gliadina (AGA) Menarini™	REF	37979
ELISA para anticorpo IgA anti-tTG humana Menarini™	REF	37795
ELISA para anticorpo IgG anti-tTG humana Menarini™	REF	37796

COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só devem ser utilizadas amostras de soro. Amostras muito hemolisadas, lipémicas ou com contaminação microbiana podem interferir com o desempenho do teste e não devem ser utilizadas. Conserve as amostras a uma temperatura entre 2 e 8 °C durante um período não superior a uma semana. Para um período de armazenamento mais prolongado, é necessário congelar as amostras de soro. Evite ciclos repetidos de congelação e descongelação das amostras.

PROCEDIMENTO Notas sobre o procedimento

- Leia atentamente este folheto informativo antes de começar o ensaio.
- Deixe as amostras de soro e os reagentes do teste à temperatura ambiente durante pelo menos 30 min antes de começar o procedimento de teste. Imediatamente após a utilização, volte a colocar as amostras e os reagentes não usados no frigorífico.
- Todas as diluições das amostras de doentes devem ser preparadas antes de iniciar o ensaio.
- Uma boa técnica de lavagem é fundamental. Se a lavagem for feita manualmente deverá usar um frasco de lavagem de boca larga para aplicar um jacto enérgico de tampão de lavagem em toda a microplaca. **Recomenda-se a utilização de um dispositivo automático de lavagem de microplacas.**
- Utilize uma pipeta multicanal com capacidade para distribuir em simultâneo material para 8 poços. Isto acelera o processo e permite um tempo de incubação mais uniforme.
- Em todos os passos é importante controlar cuidadosamente o tempo. O início de todos os períodos de incubação começa com o fim da adição de reagentes.
- A adição de todas as amostras e reagentes deve ser feita à mesma velocidade e na mesma sequência.
- Retire da bolsa as tiras de micropoços necessárias e volte a selar cuidadosamente a bolsa para impedir a condensação dos poços não usados. Volte a colocar imediatamente a bolsa no frigorífico.

Método de teste

- Passo 1** Deixe todos os reagentes e amostras atingirem a temperatura ambiente.
- Passo 2** Indique na folha do protocolo a posição das amostras nos poços. Faz parte das boas práticas de laboratório analisar as amostras em duplicado.
- Passo 3** Para a **determinação qualitativa** utilize apenas o calibrador D baixo pronto a usar (*frasco com tampa amarela*) ou para a **determinação semiquantitativa** utilize os calibradores A a D prontos a usar conforme se mostra no esquema seguinte.

DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

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

DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

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

- Passo 4** Prepare uma diluição a **1:51** da amostra do doente misturando **10 µl** de soro do doente com **0,5 ml** de diluente de soro.
- Passo 5** Pipete **100 µl** de calibradores, controlos negativo e positivo prontos a usar e da amostra do doente diluída para os micropoços adequados seguindo a folha do protocolo.
Nota: inclua também um poço com **100 µl** de diluente de soro como um branco de reagente. Ponha o leitor de ELISA a zero em relação ao branco de reagente. A absorvância do branco de reagente não deve ser superior a 0,3 quando lida contra o ar.
- Passo 6** Incube **30 min** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 7** Lave **4x** com tampão de lavagem. No caso de lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Rejeite o líquido, invertendo e batendo com pequenas pancadas em cada um dos poços, para remover o conteúdo, ou aspirando o líquido de cada poço. Para absorver na última lavagem o líquido que possa existir, inverta as tiras e bata com os poços energicamente sobre toalhetes de papel absorvente. No caso dos dispositivos de lavagem automática, programe o dispositivo de acordo com instruções do fabricante.
- Passo 8** Pipete **100 µl** de conjugado para os micropoços.
- Passo 9** Incube **30 min** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 10** Lave todos os micropoços como descrito no passo 7.
- Passo 11** Pipete **100 µl** de substrato enzimático para cada micropoço na mesma sequência e tempos usados para o conjugado.
- Passo 12** Incube **os micropoços 30 min** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 13** Pipete **100 µl** de solução de paragem para cada micropoço na mesma sequência e tempos usados para a adição de substrato enzimático. Leia a absorvância no prazo de 1 h após a adição de solução de paragem.
- Passo 14** Leia a absorvância de cada micropoço a **405 nm** usando um leitor de microplacas de comprimento de onda único ou duplo (405/630 nm) contra o branco de reagente num valor de absorvância zero.

Controlo de qualidade

Para cada ensaio realizado é necessário executar os calibradores, os controlos positivo e negativo e um branco de reagente para confirmação da integridade e exactidão do teste. A leitura de absorvância do branco de reagente deve ser $< 0,3$. O calibrador A deve ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0; caso contrário, o teste tem de ser repetido. O controlo negativo tem de ser < 20 UE/ml. Se o teste for executado em duplicado, utilize a média das duas leituras para determinar a concentração de anticorpos anti-tTG humana. Durante a execução de determinações qualitativas, a densidade óptica do calibrador D tem de ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. No caso de determinações semiquantitativas, os valores do controlo positivo têm de se situar no intervalo indicado no frasco. Recomenda-se que as amostras indeterminadas (no limiar) sejam testadas com uma amostra fresca colhida numa data posterior, para garantir a exactidão.



RESULTADOS

Cálculos

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

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Os resultados obtidos por este método devem ser apresentados como negativos ou positivos.

$$\frac{\text{Absorv. da amostra de teste}}{\text{Absorv. do calibrador D}} \times \text{UE/ml do calibrador D} = \text{UE/ml da amostra de teste}$$

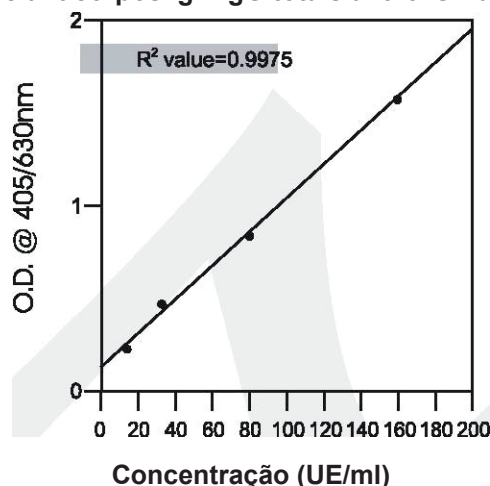
2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Trace em papel milimétrico linear um gráfico tendo como eixos as absorvâncias dos calibradores A a D e as respectivas concentrações. Represente a concentração em UE/ml no eixo X e a absorvância no eixo Y e desenhe a curva de melhor ajuste linear. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva relacionando-as com os valores de absorvância correspondentes.

Calibrador

Os calibradores prontos a usar são fornecidos para fornecer determinações semiquantitativas e têm de ser utilizados em cada execução do ensaio. As amostras de doentes que contenham níveis de anticorpos mais elevados podem produzir valores de absorvância superiores aos do calibrador A. Para determinar valores semiquantitativos exactos essas amostras de soro devem ser ainda mais diluídas de modo a que os resultados se situem dentro do intervalo da curva de calibração quando forem novamente testadas. Para determinar as UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição.

Curva-padrão de anticorpos IgA/IgG totais anti-tTG humana Menarini™



Interpretação

A informação indicada constitui apenas um guia para interpretação dos resultados laboratoriais. Estes valores foram determinados testando 113 dadores de sangue adultos normais. Os valores abaixo indicados são a média dos resultados dos indivíduos normais mais 3 DP. Cada laboratório deve determinar os seus valores normais.

Valor anti-tTG humana	Interpretação
< 20 UE/ml	Negativo
20–25 UE/ml	Indeterminado (no limiar)
> 25 UE/ml	Positivo



LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O ensaio de anticorpos anti-tTG humana Menarini™ não deve ser executado em amostras muito hemolisadas, com contaminação microbiológica ou lipémicas. O método deve ser usado exclusivamente para testar amostras de soro humano. Os resultados obtidos servem apenas como auxiliar no diagnóstico e não devem ser interpretados como sendo eles próprios diagnósticos.

VALORES ESPERADOS

Os valores esperados para uma população normal são negativos (< 20 EU/ml). Em doentes com doença celíaca, a incidência de anticorpos IgA anti-tTG foi descrita em 82-100% dos doentes com doença activa, com uma especificidade de 76-99%¹⁵. A detecção combinada de anticorpos IgG e IgA anti-tTG, conforme descrita por *Seissler et al*, forneceu uma sensibilidade de 95% com especificidade de 99%¹⁶. A incidência e os níveis de anticorpos anti-tTG depende do estado da dieta. Os níveis destes anticorpos diminuem e acabam mesmo por se tornar negativos em doentes com doença celíaca que tenham uma dieta sem glúten. Da mesma forma, os níveis destes anticorpos aumentam e acabam mesmo por se tornar positivos em doentes com doença celíaca que tenham feito uma dieta sem glúten e que tenham mudado para uma dieta com glúten¹⁷⁻²¹.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade do ensaio ELISA para anticorpos totais anti-tTG humana Menarini™ foi determinada através de comparação dos resultados com:

- a) os achados clínicos;
- b) anticorpos anti-endomísio (EMA).

Intervalo normal: O intervalo normal foi estabelecido através do teste de 65 amostras de soro de dadores aparentemente saudáveis recrutados na Cruz Vermelha. A média mais três desvios-padrão da média desta população normal foram utilizados para determinar o valor-limite entre indivíduos normais e indivíduos positivos com resultados no limar.

Especificidade e sensibilidade comparativas:

A. Correlação clínica: Foi obtido um total de 200 amostras de soro em doentes com doença celíaca com e sem deficiência de IgA; vários controlos da doença incluíram soros de doentes com diagnóstico clínico de doenças bolhosas como penfigos, penfigóide e outra doença dermatológica, psoríase; foram testados indivíduos normais para anticorpos totais anti-tTG. A incidência de anticorpos anti-tTG totais na doença celíaca e noutros controlos da doença é mostrada a seguir. Quatro indivíduos normais com resultados positivos foram fracamente positivos.

Diagnóstico	N.º testados	N.º positivos
Doença celíaca	94	75*
Deficiência de IgA		
Doença celíaca	15	15
Não celíaca	13	0
Dermatite herpetiforme	22	14
Controlos da doença	56	2
Normal	65	4



*As 19 amostras de doentes com doença celíaca que foram negativas para os anticorpos anti-tTG totais foram testadas nos ensaios ELISA para IgG anti-tTG e ELISA IgA anti-tTG. Em todos os casos, as 19 amostras foram negativas nos dois ensaios ELISA diferentes. O mais provável é que estes doentes estivessem a fazer uma dieta sem glúten.

B. ELISA para anticorpos totais anti-tTG humana *versus* anticorpos anti-endomísio (EMA): Foi testado no kit para anticorpos totais anti-tTG humana Menarini™ e no kit de teste EMA um total de 200 amostras. Duas das quatro amostras positivas no kit para anticorpos totais anti-tTG Menarini™ e negativos no EMA pertenciam a doentes com dermatite herpetiforme e apresentaram resultados fracos positivos. As outras duas amostras falsas positivas pertenciam ao conjunto de população com penfigus/penfigóide. Três das cinco amostras negativas no kit para anticorpos totais anti-tTG Menarini™ e positivas no EMA apresentavam títulos inferiores ou iguais a 10. As outras amostras no subgrupo de doentes com doença celíaca apresentaram títulos de 40 e 20 com resultados de 14,6 UE/ml e 19,8 UE/ml, respectivamente.

Menarini™ Anticorpos totais anti-tTG humana		EMA Menarini™		Total
		Positivo	Negativo	
	Positivo	102	4	106
	Negativo	5	89	94
	Total	107	93	200

Concordância relativa: 96%
 Sensibilidade relativa: 95%
 Especificidade relativa: 96%

C. Reactividade cruzada: foi testado um total de 56 controlos (doentes com doenças do tecido conjuntivo, como psoríase, doenças bolhosas auto-imunes, como penfigus e penfigóide). Dois foram fracamente positivos.

Precisão:

Com base em 10 replicados, foi calculado o coeficiente de variação (CV) intra-ensaio e inter-ensaios do teste ELISA para anticorpos totais anti-tTG humana.

	Inter-ensaios CV	Intra-ensaio CV
Alta	5,5%	3,8%
Média	9,7%	5,8%
Baixa	8,5%	6,4%
Valor-limite (20 UE/ml)	11%	9%

Linearidade:

Para determinar uma linearidade aceitável, as placas foram analisadas com calibradores de valores conhecidos. Foram determinados os valores de r-quadrado da curva-padrão. Um valor de r-quadrado superior a 0,95 foi considerado como sendo adequado. O valor médio de r-quadrado para este ensaio foi de 0,9975. Nenhum valor foi inferior a 0,9929.

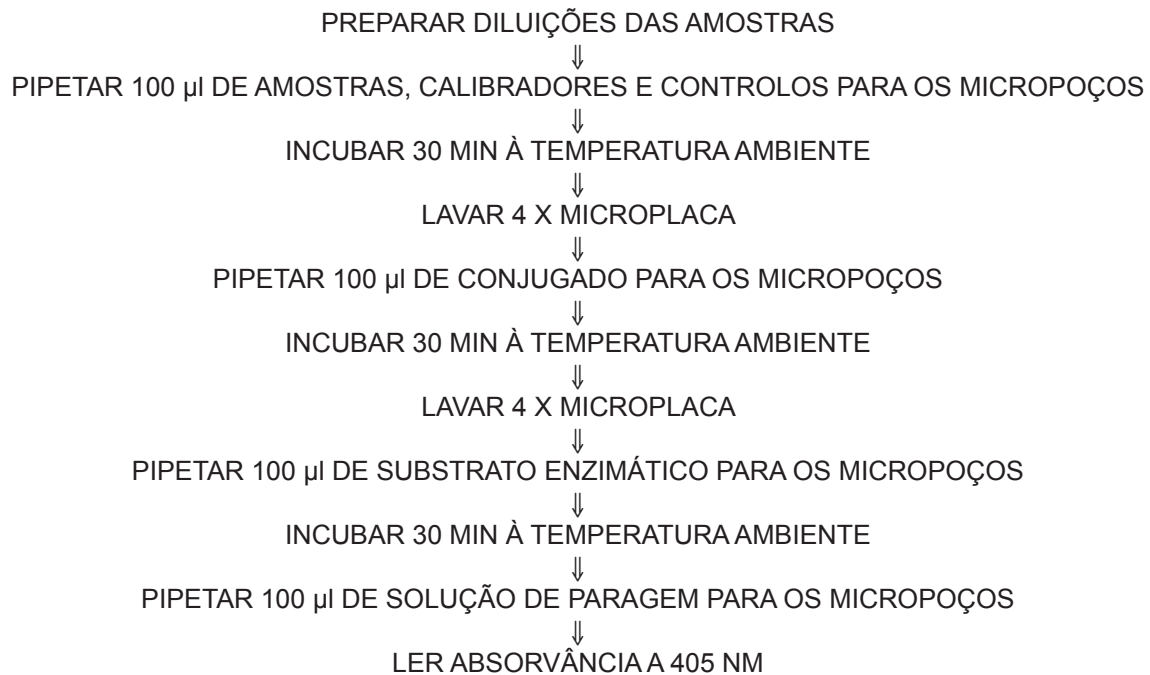
Recuperação:

Amostras com concentrações de anticorpos IgG anti-tTG humana conhecidas foram misturadas com diluições adequadas de outra amostra positiva com níveis de anticorpos anti-tTG humana conhecidos. Foram determinados os níveis de anticorpos anti-tTG humana das amostras misturadas e a partir desses valores foi calculada a percentagem de recuperação. Os resultados foram os seguintes:



	Anticorpos anti-tTG humana		Recuperação (%)
	Conc. antic. adicionada (UE/ml)	Conc. antic. obtida (UE/ml)	
Amostra 1	54,1	53,7	99,4
Amostra 2	73,8	86,5	117,2
Amostra 3	89,3	106,1	118,7

RESUMO DO PROCEDIMENTO Menarini™






REFERENCES • BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Guandalini S, Gupta P. Celiac disease- A diagnostic challenge. *Clin Appl Immun Rev* 2002;2:293-305.
2. Fasano A, et al. Prevalence of celiac disease in at risk and not-at-risk groups in the United States 2003; 163:286-292.
3. Wolber R, et al. Lymphocytic gastritis in patients with celiac sprue or spruelike intestinal disease. *Gastroenterology* 1990;98:310-315.
4. Catassi, et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma in celiac disease. *JAMA* 2002;287:1413-1419.
5. Arranz E, Ferguson A. Intestinal antibody pattern of celiac disease: Occurrence in patients with normal jejunal biopsy histology. *Gastroenterology* 1993;104:1263-72.
6. Hill ID, et al. Celiac disease: Working group report of the first world congress of pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35:S78-S88
7. Vitoria JC, et al. Antibodies to gliadin, endomysium, and tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:571-4.
8. Rittmeyer C, Rhoads JM. IgA deficiency causes false-negative endomysial antibody results in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1996 23:504-6.
9. Kumar V, Jarzabek-Chorzelska M, Sulej J, Rajadhyaksha M, Jablonska S. Tissue transglutaminase and endomysial antibodies-diagnostic markers of gluten-sensitive enteropathy in dermatitis herpetiformis. *Clin Immunol*. 2001;98:378-82.
10. Lagerqvist, C. Ivarsson, A., Juto, P. Persson, L. A. Hernell, O. Screening for adult coeliac disease - which serological marker(s) to use? *J Intern Med* 250:241-248, 2001.
11. Lilic D, Sewell WA. IgA deficiency: what we should-or should not-be doing. *J Clin Pathol* 2001 54:337-8.
12. Seidman EG, Hollander GA. Autoimmunity with immunodeficiency: a logical paradox. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999 ;28:377-9.
13. Sleasman JW. The association between immunodeficiency and the development of autoimmune disease. *Adv Dent Res* 1996;10:57-61.
14. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health; 1993 (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
15. Korponay-Szabo IR, Dahlbom I, Laurila K, et al. Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. *Gut*. 2003;52:1567-1571.
16. Leon F, R-Pena C, Sanches L et al. Anti-transglutaminase IgA ELISA: Clinical potential and drawbacks in celiac disease diagnosis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:849 853.
17. Seissler J, Boms S, Wohlrab U et al. Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase measured by radioligand assay: evidence for high diagnostic sensitivity for celiac disease. *Horm Metab Res* 1999;31:375-379.
18. Kumar V et al. Celiac disease and immunoglobulin a deficiency: how effective are the serological methods of diagnosis? *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9:1295-300.
19. Cataldo F, Lio D, Marino V, Picarelli A, Ventura A, Corazza GR. IgG antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency. Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue. *Gut*. 2000 47:366-9.
20. Sulkanen S, Haltunen T, Laurila K, et al. Tissue Transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*; 1998, 115:1322-1328.
21. Dietrich W, Laag E, Schopper H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease; *Gastroenterology* 1998, 115:1317-1321.



 **A. Menarini Diagnostics S.r.l.**
via Sette Santi 3
50131 Firenze
Italia

EL

Διανέμεται στην
ΕΛΛΑΔΑ από την
A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argyroupolis
Attiki

AT

ÖSTERREICH
Vertrieb durch
A. Menarini Ges.m.b.H
Pottendorfer Straße, 25/27
A - 1120 Wien

BE

BELGIQUE
Distribué par
A. Menarini Diagnostics
Benelux S.A./N.V.
Belgicastraat, 4
1930 Zaventem

PT

PORTUGAL
Distribuido por
A. Menarini Diagnósticos, Lda
Quinta da Fonte
Edifício D.Manuel I, 2ºB
2770-203 Paço de Arcos

NL

NEDERLAND
Distributed by
A. Menarini Diagnostics
Benelux N.V.
De Haak, 8
5555 XK Valkenswaard

Date of issue: March 2007
Data de publicação: Março de 2007
Ausgabedatum: März 2007
Date d'émission : Mars 2007
Ημερομηνία έκδοσης: Μάρτιος 2007

Document No. PI4144S M

