

## Souprava Tissue Transglutaminase IgA / IgG ELISA

### Kvantitativní a kvalitativní test na protilátky proti tkáňové transglutamináze

Kód výrobku GD71 / GD72 (96 testů)  
& GD71A/GD72A (48 testů)

Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

20030103

#### 1. Použití

Soupravy Tissue Transglutaminase IgA / IgG představují rychlou metodu detekce protilátek IgA a IgG vytvořených proti tkáňové transglutamináze (t-Tg). Tyto soupravy byly navrženy tak, že pro ně platí stejný protokol jako pro soupravy Gliadin IgG a Gliadin IgA firmy Genesis (GD16 a GD17). Komponenty této soupravy jsou určeny pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

#### 2. Vysvětlení testu

Pacienti citliví na lepek produkují protilátky IgA a IgG proti lepku a proti submukóze. V nedávné době byla tkáňová transglutamináza, na kalcium-dependentní enzym, který katalyzuje přeměnu specifických polypeptidových glutaminových zbytků, identifikována jako neznámý submukózní antigen. Je zajímavé, že gliadin je přednostním substrátem pro tyto enzymy tvořící antigenní neo-epitopy, o kterých se domníváme, že u geneticky náchylných jedinců vyvolávají imunitní odpovědi.

Imunologická detekce protilátek působících proti vlastním tkáním pacienta vytvořených proti t-Tg je praktický nástroj pro diagnostikování další sledování coeliakie. Přítomnost protilátek působících proti vlastním tkáním pacienta vytvořených proti t-Tg má úzký vztah k detekci protilátek vytvořených proti submukóze nepřímou imunofluorescencí. Metoda ELISA umožňuje ekonomické a rychlé vyšetření velkého počtu pacientů na přítomnost latentního nebo subklinického onemocnění.

Tento rozbor používá rekombinantní lidskou tkáňovou transglutaminázu, o které bylo v řadě studií zjištěno, že poskytuje vyšší přesnost testu, než běžné používané testy ELISA používající antigeny mořčete.

#### 3. Princip testu

Zředěné vzorky séra se inkubují s rekombinantní tkáňovou transglutaminázou imobilizovanou v jamkách mikrotitrační destičky. Po smytí nenavázaných složek krevního séra se do jamek přidá králičí IgA (nebo IgG) silně reagující s lidskými antigeny konjugovaná v peroxidáze, a tento imunoglobulin se během druhé inkubace naváže na protilátky vázané na povrchu. Nenavázaný konjugát se odstraní promytím a do jamek se přidá roztok obsahující 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) a enzymatický substrát, které označí navázané specifické protilátky. Přidání stop-roztoku reakci zastaví, a poskytne správné pH pro vznik zabarvení. Optická hustota standardů, kontrolních vzorků a testovaných vzorků se měří čtečkou mikrotitračních destiček (readerem) Elisa s filtrem 450 nm. Optická hustota je úměrná aktivitě protilátek ve vzorku.

#### 4. Materiály dodávané v soupravě

- **Mikrotitrační destička** 96 jamek na odlamovacích prouzcích formátu 12 x 8, předem pokrytých rekombinantní lidskou tkáňovou transglutaminázou, s držákem, uložená v plastovém sáčku s vysoušedlem.
  - **Reagens 1: Roztok pro ředění vzorků**, 150 mM, pufovaný solný roztok, pH 7,2, s antimikrobiální přísadou, obsah 15 ml, (barva modrá), 15násobná koncentrace.
  - **Reagens 2: Promývací pufr**, pufovaný solný roztok s detergentem, pH 7,2, obsah 15 ml, 15násobná koncentrace.
  - **Reagens 3: Konjugát**, králičí IgG (barva červená) nebo IgA (barva žlutá) silně reagující s lidskými antigeny konjugovaný v peroxidáze v roztoku stabilizujícím proteiny s antimikrobiální přísadou, obsah 12 ml nebo 6 ml (pro 48 testů), připraveno k okamžitému použití.
  - **Reagens 4: TMB substrát**, vodný roztok TMB a peroxidu vodíku, obsah 12 ml, připraveno k okamžitému použití.
  - **Reagens 5: Stop-roztok**, 0,25molární kyselina sírová, obsah 12 ml, připraveno k okamžitému použití.
  - **T-Tg IgA Standardy**: 0; 7; 25; 50 a 100 U/ml,
  - **T-Tg IgG Standardy**: 0; 15; 50 a 100 U/ml
- každá ampule se standardem obsahuje 1 ml nebo 0,5 ml (pro 48 testů) 10mM pufovaného solného roztoku obsahujícího IgG nebo IgA protilátky lidského séra proti tkáňové transglutamináze, připraveno k okamžitému použití.
- **Pozitivní kontrolní vzorek**: 1 ml nebo 0,5 ml (pro 48 testů); 10mM pufovaný solný roztok obsahující IgA nebo IgG protilátky lidského séra proti tkáňové transglutamináze, připraveno k okamžitému použití.
  - **Negativní kontrolní vzorek**: 1 ml nebo 0,5 ml (pro 48 testů); 10mM pufovaný solný roztok obsahující normální lidské sérum, připraveno k okamžitému použití.
  - **Návod k použití soupravy**

#### 5. Další zařízení potřebné k provedení testu

- zkumavky na vzorky
- kalibrovaný odměrný válec pro přípravu promývacího roztoku
- přesné pipety a jednorázové špičky pro dávkování 20 µl, 100 µl a 1 ml
- promývačka mikrotitračních destiček EIA nebo vícekanálová pipeta nebo promývací láhev
- destilovaná nebo deionizovaná voda
- savý papír
- reader EIA s filtrem 450 nm, případně s referenčním filtrem 620 nm

#### 6. Upozornění

##### 6.1 Bezpečnost práce

1. Všechny reagenty této soupravy jsou určeny pro diagnostické použití *in vitro*.
2. Tento test by měl provádět pouze zkušený laboratorní personál. Je nutné striktně dodržovat protokol testu.
3. Veškerý materiál lidského původu použitý pro přípravu standardů a kontrolních vzorků, které jsou součástí tohoto výrobku byl otestován na obsah protilátek proti HIV, HBsAg a HCV, a byl shledán negativní. Žádná testovací metoda však nemůže poskytnout úplnou jistotu, že v materiálu není přítomen infekční agens. Proto by se mělo s veškerými reagenty obsahujícími materiál lidského původu zacházet jako s materiály potenciálně infekčními. Pracovníci by měli mít při práci se sérem pacienta, nebo s produkty ze séra vyrobenými, rukavice a ochranný oděv.
4. Reagenty této sady obsahují antimikrobiální látky a roztok substrátu obsahuje 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Zabraňte kontaktu s pokožkou a očima. Pokud ke kontaktu dojde, omyjte postižené místo velkým množstvím vody.
5. Stop-roztok obsahuje 0,25M kyselinu sírovou. Zabraňte kontaktu s pokožkou nebo jeho vniknutí do očí. Pokud ke kontaktu dojde, omyjte postižené místo velkým množstvím vody.
6. Jakákoli kapalina, která přijde do kontaktu s potenciálně infekčním materiálem, musí být zlikvidována v kontejneru s dezinfekčním prostředkem. Likvidace musí být provedena v souladu s místní legislativou.

##### 6.2 Technické poznámky

1. Stripy a roztoky by se neměly používat pokud jsou obaly, ve kterých byly uloženy, porušené nebo pokud prosakují.
2. Před použitím nechejte všechny reagenty a mikrotitrační destičku zahřát na pokojovou teplotu. Zabezpečte, aby byl plastový sáček obsahující nepoužité stripy mikrotitrační destičky dobře uzavřen, a aby v něm bylo vloženo vysoušedlo. Skladujte je při teplotě 2–8 °C.
3. Při každém testu použijte i pozitivní kontrolní vzorek a negativní kontrolní vzorek, abyste mohli monitorovat stabilitu reagentů a správné provedení testu.
4. Přesně dodržujte uvedené doby a teploty inkubace.
5. Zajistěte, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi jamkami. Všechny pipety a další zařízení použité pro enzymatický konjugát ukládejte zcela odděleně od reagentu substrátu.
6. Při náběru konjugátu nebo TMB substrátu pipetou by mělo být nabráno takové množství reagentu, aby nebylo nutno špičku pipety opakovaně nořit do ampule s reagentem. Nepoužitý reagens nikdy nevracujte zpět do původních nádob.
7. Mezi inkubačními kroky nenechávejte mikrotitrační jamky vyschnout.
8. Přesně dodržujte popsaný promývací postup. Nedostatečné promytí může způsobit falešné výsledky.
9. Během všech inkubačních kroků zabraňte osvětlení destičky přímým slunečním světlem nebo jejím vystavení zdroji tepla.
10. Barevné uzávěry reagentů nasadte zpět na správné ampule. Zabráněte tím křížové kontaminaci.
11. Je důležité dávkovat do jamek všechny vzorky pacienta i všechny kontrolní vzorky bez prodlevy. Proto se před započítáním práce ujistěte, že všechny reagenty jsou připraveny k okamžitému použití.

#### 7. Trvanlivost a skladovací podmínky

Po převzetí soupravu skladujte při teplotě 2–8 °C. Po otevření jsou látky soupravy stabilní po dobu tří měsíců (nebo do konce expirační doby, pokud je tato kratší než tři měsíce). Nepoužívejte soupravy s prošlou lhůtou expirace. Žádnou část soupravy nezmrazujte. Zředěný promývací roztok uložený v uzavřené láhvi při teplotě 2–8 °C má trvanlivost 3 měsíce.

#### 8. Odběr a skladování vzorků

Při dlouhodobém používání a skladování mohou být vzorky séra uloženy při teplotě -20 °C. Po rozmrazení se vzorky musí před testem dobře rozmíchat. Opakované zmrazování a rozmrazování může ovlivnit výsledky testu. Nepříznivý vliv na výsledky může mít i přidání konzervačních látek. Neměly by se používat vzorky mikrobiálně kontaminované, tepelně ošetřené nebo vzorky obsahující pevné částice. Vyhněte se používání silně hemolyzovaných nebo lipemických vzorků.

#### 9. Příprava reagentů

1. Rozředte roztok pro ředění vzorků (**Reagens 1**) v poměru 1:14 destilovanou vodou, abyste měli dost pufru pro provedení celého testu.
2. Rozředte promývací roztok (**Reagens 2**) v poměru 1:14 destilovanou vodou, abyste měli dost pufru pro provedení celého testu.
3. Předředte vzorky odebrané pacientovi v poměru 1:101 naředěným roztokem pro ředění vzorků (např.: 10 µl séra plus 1ml roztoku).

**10. Pracovní postup**

1. Vyberte potřebný počet stripů pro test.
2. Pro kvantitativní rozbor dávkujte 100 µl každého standardu, pozitivního a negativního kontrolního vzorku a rozředěného vzorku pacienta do příslušných jamek.

Pro kvalitativní rozbor, dávkujte jen Standard 7 U/ml pro IgA nebo Standard 15 U/ml pro IgG.

3. Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
4. Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek a třikrát je promyjte v automatické promývačce mikrotitračních destiček nebo ručním promytím (viz níže). Pečlivé promytí je klíčem k dobrým výsledkům. Před dalším krokem osušte jamky savým papírem. **Nenechávejte jamky vyschnout.**

**Postup pro ruční promývání:**

Jamky vyprázdněte tak, že destičku obrátíte. Pomocí vícenásobné pipety nebo promývací láhve jamky naplňte promývacím pufrům. Opět jamky vyprázdněte obrácením destičky, a osušte je savým papírem. Tento proces opakujte ještě dvakrát.

5. Do každé jamky dávkujte 100 µl konjugátu (**Reagens 3**). Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
6. Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek, a pečlivě je čtyřikrát promyjte promývacím pufrům. Oklepejte destičku na savý papír, abyste odstranili poslední kapky promývací kapaliny.
7. Pomocí složené dávkovací pipety rychle do každé jamky dávkujte 100 µl TMB Substrátu (**Reagens 4**). Inkubujte destičku po dobu **10 minut**.
8. Do každé jamky přidejte 100 µl Stop-roztoku (**Reagens 5**). Aby byly dodrženy stejné doby reakce, měl by být stop-roztok dávkován do jamek ve stejném sledu jako do nich byl dávkován TMB substrát.
9. Do limitu 10 minut odečtete optickou hustotu (OD) každé jamky readerem s filtrem 450 nm. Jako referenční prostředek lze použít i filtr 620 nm.

**11. Zabezpečení kvality**

Data pro zabezpečení kvality jsou uvedena na certifikátu šarže, který je přiložen k sadě.

Účelem pozitivního kontrolního vzorku je sledování, zda nedošlo k vážnému selhání reagentů.

Každá jamka, která je podle spektrofotometru pozitivní, ale nemá viditelné zabarvení, by se měla z rubu vyčistit, a měla by být znovu změřena. Pokud by byly zjištěny hodnoty nižší než nula, měly by být zkontrolovány použité vlnové délky, reader by měl být znovu nastaven na základní hodnoty a měření by se mělo zopakovat

**12. Interpretace výsledků****Kvantitativní výsledky**

Pomocí souřadného systému vyneste do grafu hodnoty optické hustoty každého ze standardů ve vztahu k jejich koncentraci a spojte je křivkou. Z této křivky zjistíte hodnoty neznámých. Pacienti s aktivní coeliakií mají hodnoty t-Tg IgA nad 7 U/ml. Hodnota Tg IgG nad 17 U/ml se považuje za zvýšenou. Výsledky mezi 15 – 17 U/ml jsou hraniční. Protilátky IgG nejsou pro coeliakií specifické.

Po několika týdnech bezlepkové diety může hladina tkáňové transglutaminázy klesnout na normální úroveň.

Normální rozsah je:  
IgA 0 - 7 U/ml  
IgG 0 - 15 U/ml

*V ideálním případě by si každá laboratoř měla stanovit svůj vlastní patologický rozsah.*

**Kvalitativní výsledky**

t-Tg IgA: Vzorky s OD vyšší než OD standardu 7 U/ml jsou pozitivní.  
t-Tg IgG: Vzorky s OD vyšší než OD standardu 15 U/ml jsou pozitivní

**13. Limity postupu**

1. Z důvodu vysoké počtu případů deficiencie IgA při coeliakií, mohou mít někteří pacienti falešné negativní výsledky.
2. Výsledky tohoto rozboru by měly být interpretovány v souladu s dalšími klinickými nálezy. Diagnóza by neměla být založena pouze na výsledku testu na protilátky proti tkáňové transglutamináze.

**14. Parametry testu**

Soupravou anti t-Tg IgA ELISA bylo testováno 44 vzorků od pacientů, kteří prokazatelně trpěli produkcí protilátek proti submukóze jak bylo stanoveno nepřímou imunofluorescencí. V tabulce vidíte parametry testu provedeného na základě této studie.

Genesis\_GD71, GD72 Transglutaminaza IgA, IgG

Citlivost	100%
Přesnost	97%
Pozitivní předpovězená hodnota	95%
Negativní předpovězená hodnota	100%
Celková přesnost	99%

**15. Reprodukovatelnost pro soupravy t-Tg IgG a t-Tg IgA ELISA**

Odchylka v rámci jedné soupravy < 8%  
Odchylka mezi soupravami < 12%

**Shrnutí postupu**

- Zředte sérum roztokem na ředění vzorků (**Reagens 1**) v poměru 1 : 100.
- Do jamek mikrotitrační destičky dávkujte pozitivní kontrolní vzorek, negativní kontrolní vzorek a zředěný testovaný vzorek.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- *Jamky promyjte třikrát.*
- Do každé jamky dávkujte 100 µl konjugátu (**Reagens 3**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- *Jamky promyjte čtyřikrát.*
- Do každé jamky přidejte 100 µl TMB substrátu (**Reagens 4**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **10 minut**.
- Do každé jamky přidejte 100 µl stop-roztoku (**Reagens 5**).
- Sledujte optickou hustotu s filtrem 450 nm (jediná vlnová délka) nebo 450 nm a 620 nm (dvojitá vlnová délka).

**16. Literatura**

Sblattero D et al (2000) Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease. *Am J Gastroenterol* 95 (5),1253-7

Sardy M et al (1999) Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. *Clin Chem*, 45 (12), 2142-9

Dieterich, T et al (1998) Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*, 115, 1317- 1321

Sulkanen S et al (1998) Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*, 115:1332-1328

Dieterich, T et al (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. *Nature Medicine*, 3(7), 797-801

Sollid, M et al (1997) Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase - guilt by association? *Gut*, 41, 851-852

Maki, M (1997) Tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease *Gut*, 41(4), 565-566

Marsh, M N (1997) Transglutaminase, gluten and coeliac disease: Food for thought. *Nature Medicine*, 3 (7), 725-726

**Výrobce:****Genesis Diagnostics Ltd.**

Eden Research Park, Henry Crabb Road, Littleport,  
Cambridgeshire, CB6 1SE, United Kingdom  
Tel 01353 862220 Fax 01353 863330

**Distributor pro ČR: LABOSERV s.r.o.**

Hudcova 532/78b, 612 00 Brno  
Tel. 541 243 113, Fax: 541 243 114  
e-mail laboserv@laboserv.cz  
http://www.laboserv.cz