



Soupravy Gliadin IgG a Gliadin IgA ELISA

Kvantitativní a kvalitativní testy pro protilátky gliadin IgG a gliadin IgA

Kódy výrobků GD 16 a GD 17 (96 testů)

Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

2001-10-29

1. Použití

Souprava Gliadin IgG a Gliadin IgA slouží jako rychlá metoda detekce protilátek vytvořených v lidské krevní séru proti gliadinu, hlavní složce pšeničného, ječného a žitného lepku. Tato souprava používá reader Elisa. Dodává se jako pomůcka pro diagnostiku coeliakie, nesnášenlivosti lepku v potravě. Komponenty této soupravy jsou určeny pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

2. Vysvětlení testu

Gliadin je směs proteinů rozpustných v alkoholu, které se nazývají prolaminy. Obsahují glutimin. Jsou přítomné v pšeničném, ječném a žitném lepku. Tyto proteiny jsou spojovány s chorobnými projevy coeliakie a s enteropatií senzitivní na lepek. Tyto proteiny způsobují charakteristické změny na sliznici tenkého střeva. Těmto symptomům se lze vyhnout pokud pacienti začnou dodržovat přísnou bezlepkovou dietu. Úzkou spojitost s coeliakií mají protilátky IgG a IgA vytvořené v séru proti gliadinu.

3. Princip testu

Zředěné vzorky séra se inkubují s gliadinem imobilizovaným v jamkách mikrotitrační destičky. Po smytí nenavázaných složek krevního séra se do jamek přidá králičí IgG nebo IgA 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 přímo úměrná aktivitě protilátek ve vzorku.

4. Materiály dodávané v soupravě

- **Mikrotitrační destička** 96 jamek na odlamovacích proučcích formátu 12 x 8, předem pokrytých gliadinem, s držákem, uložená v plastovém sáčku s vysoušečem.
- **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, 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.
- **Standardy**: 0; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 U/ml, po 1 ml 10mM pufovaný solný roztok obsahující IgG nebo IgA protilátky lidského séra proti gliadinu, připraveno k okamžitému použití.
- **Standard pro kvalitativní test**: 10 U/ml (pouze IgG), 4 U/ml (pouze IgA, obsah 1 ml, 10mM pufovaný solný roztok obsahující IgG nebo IgA protilátky lidského séra vytvořené proti gliadinu, připraveno k okamžitému použití
- **Positivní kontrolní vzorek**: 1 ml 10mM pufovaný solný roztok obsahující IgA nebo IgG protilátky lidského séra proti gliadinu, připraveno k okamžitému použití.
- **Negativní kontrolní vzorek**: 1 ml 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 roztoky
- 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 pouze 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 0,25molární 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. Proužky (stripy) a roztoky by se neměly používat pokud jsou sáčky, ve kterých byly uloženy, porušené, anebo pokud prosakují.
2. Před použitím nechejte všechny reagenty a mikrotitrační destičku zahřát na pokojovou teplotu. Zabezpečte, aby byl plastový sáček obsahující nepoužité proužky mikrotitrační destičky dobře uzavřen, a aby v něm bylo vloženo vysoušečlo. 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 dávkování 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 popsany promývací postup. Nedostatečné promytí může způsobit silný falešný signál.
9. Během všech inkubačních kroků zabraňte osvětlení destičky přímým slunečním světlem nebo jejím vystavení zdroji tepla.
10. Barevné uzávěry nasadte zpět na správné ampule. Zabráňte 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 soupravy 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 soupravu s prošlou lhůtou expirace. Žádnou část soupravy nezmrazujte. Zředěný promývací roztok uložený v uzavřené láhvi při teplotě 2 – 8 °C má trvanlivost 3 m ěsíce.

8. Odběr a skladování vzorků

Při dlouhodobém používání a skladování mohou být vzorky séra uloženy při teplotě -20 °C. Po rozmrazení se vzorky musí p řed 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. Rozředte vzorky odebrané pacientovi v poměru 1:100 naředěným roztokem pro ředění vzorků (např.: 10 µl séra plus 1ml roztoku).

10. Pracovní postup

1. Vyberte počet proužků potřebný 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 10 U/ml, pozitivní kontrolní vzorek a vzorek pacienta.
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). Pečlivě promyťte 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. Oklepteje 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 odečtěte 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 vzájemnému 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**Kvalitativní výsledky**

Gliadin IgG: Vzorky s OD > 10 U/ml IgG standard jsou pozitivní.

Gliadin IgA: Vzorky s OD > 4 U/ml IgA standard jsou pozitivní

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. Stanovili jsme prozatímní normální hodnoty, které jsou pro gliadin IgG protilátky nižší než 10 U/ml a pro gliadin IgA protilátky jsou nižší než 3 U/ml. Vzorky, které vykazují hodnotu gliadin IgA mezi 3 a 4 U/ml jsou na hranici. U pacientů, kteří rozvinutou coeliakii, lze naměřit hodnoty nad 4 U/ml pro protilátky IgA a nad 10 U/ml pro protilátky IgG.

13. Limity postupu

1. Pro určení hodnot protilátek IgA proti gliadinu je důležité znát stav hladiny protilátek IgA pacienta změřením celkové hladiny IgA v krevním séru pacienta, protože při onemocnění coeliakii existuje mnoho případů deficiencie IgA.
2. U všech pacientů s hodnotami protilátek IgG vytvořených proti gliadinu vyššími než 10 U/ml by se měla změřit hladina protilátek IgA proti gliadinu nebo tkáňové transglutamináze (GD70/GD71), protože mnoho pacientů vykazuje zvýšenou hladinu protilátek IgG proti gliadinu ačkoli coeliakii neonemocněli.
3. U pacientů s Downovým syndromem a se systémovými autoimunitními onemocněními by se měly výsledky interpretovat obezřetně, protože tyto skupiny pacientů také vykazují zvýšenou hladinu protilátek proti gliadinu.

14. Parametry testu**Diagnostická Citlivost a přesnost**

Založena na základě analýzy 53 případů pacientů s potvrzenou coeliakii, 35 pacientů s léčenou coeliakii a s Dermatitis Herpetiformis, 90 případů bez coeliakie a 194 dospělých dárců krve.

Gliadin IgG	pozitivní onemocnění	negativní onemocnění
pozitivní	45	17
negativní	8	302

Citlivost: 84,9%

Přesnost: 94,7%

Gliadin IgA	pozitivní onemocnění	negativní onemocnění
pozitivní	34	13
negativní	19	306

Citlivost: 64,2%

Přesnost: 95,9%

15. Reprodukovatelnost**Přesnost v rámci jedné soupravy**

	průměr	CV%	n
IgA Pozitivní	134.5	4	10
IgA Negativní	3.2	3	10
IgG Pozitivní	32.4	2	10
IgG Negativní	9.3	6	10

Přesnost mezi soupravami

	průměr	CV%	n
IgA Pozitivní	140	7	3
IgA Negativní	3.1	8	3
IgG Pozitivní	141	5	3
IgG Negativní	32.3	12	3

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 (dvojí vlnová délka).

Doporučená literatura

- Maki, M *et al.* (1988) Changing pattern of childhood coeliac disease in Finland *Acta Paediatr. Scand.*, 77, 408-412
- Guandalini, S *et al.* (1989) Diagnosis of coeliac disease: Time for a change? *Arch Dis Child* 64, 1320-1325
- Caiulo, L *et al.* (1991) *Riv Ital Pediatr* 17, 691-695
- Greco, L *et al.* (1991) Multi-centre study on the frequency of identified cases of coeliac disease in Europe and in the Mediterranean area. *ESPGAN, Capri*, 11-12 October 1991
- Ceccarelli, M *et al.* (1991) Is childhood disease under-diagnosed? *Eur J Paediatrics* 150,821-822

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

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

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

Hudcova 78b, 612 00 Brno
Tel. 05/41243113, Fax 05/ 41243114
e-mail laboserv@laboserv.cz