



iagnosticum Zrt.

H-1047 Budapest, Attila u. 126.

Tel.: +36-1-369-3684, +36-1-369-7913

Fax: +36-1-369-4383

CE

TG-IgA-Teszt

ELISA reagenskészlet
t-transzglutamináz IgA ellenanyagok kimutatása
humán szérumban.

Kiszerezés: 12 tesztsík, 1x96 vizsgálathoz
Gyári kódszám: 102701
EEKH nyilv. szám: HU/CA01/1986/04

A KÉSZLET TARTALMA:

t-transzglutamináz antigénnel érzékenyített mikrotitráló lemez	1 db
IgA pozitív kontroll szérum (piros)	1300 µl
IgA küszöbkontroll szérum (rózsaszín)	1300 µl
IgA negatív kontroll szérum (kék)	1500 µl
Anti-humán IgA-HRPO konjugátum (sárga)	120 µl
PBS-Tween 20 mosó-hígító puffer (10x)	50 ml
TMB szubsztrát oldat	16 ml
0,25M kénsav	18 ml
Lezáró öntapadó lap	2 db

A VIZSGÁLAT ELVE:

A TG-IgA-TESZT ELISA készlet egy szilárdfázisú, enzimmel jelzett immundiagnosztikai módszeren alapul, mely gluten érzékeny egyedek szérumban, vagy plazmájában lévő t-transzglutamináz IgA ellenanyagok kimutatására alkalmas.

A mikrotitráló lemezen kötött t-transzglutamináz antigénnel reagálnak a szérum- vagy plazma mintákban lévő specifikus IgA autoantitestek. Az így képződött immunkomplexek a következő lépésben bemért anti-human IgA-tormaperoxidázzal jelzett ellenanyaggal reagál. Az enzimre specifikus TMB szubsztrát oldattal kapott színreakció, mely arányos a lemezen lejátszódó immunreakcióban képződött komplex mennyiségével, ELISA fotométeren 450nm-en mérhető.

Az eredmények a pozitív ill. negatív kontrollszérumokkal értékelhetők a mintában lévő specifikus ellenanyagok kontrollra vonatkoztatott relatív koncentrációja (TgAE = transzglutamináz ellenanyag egység) alapján.

Az anti t-transzglutamináz IgA ellenanyagok vizsgálata az anti-endomysium IgA ellenanyagokkal együtt a leginkább elterjedt specifikus teszt egyrészt, a gluten-intoleranciás betegcsoport szűrésére a jejunális biopsziát megelőzően, másrészt a kezelés és diéta monitorozására.

A MÉRÉS ELVÉGZÉSÉHEZ SZÜKSÉGES EGYÉB ANYAGOK ÉS KÉSZÜLÉKEK:

Ionmentes vagy desztillált víz.

5-40, 20-200, és 200-1000 µl-es automata pipetták.

Üvegedények a hígításhoz és méréshez.

37 °C-os termosztát.

ELISA fotométer, 450 nm-es színszűrővel.

A KIT TÁROLÁSA, KEZELÉSE:

A kit minden komponensét 2-8 °C-on kell tárolni.

Felhasználni, bontatlan állapotban, a címkén feltüntetett ideig szabad.

Felbontott komponensek minőségének megőrzése a felhasználó felelőssége, a gyártó erre garanciát nem vállal.

Egy órával a felhasználás előtt a szükséges komponenseket hagyjuk szobahőmérsékletre felmelegedni.

A vizsgálat megkezdéséig a titrálólemez szükséges mennyiségű tesztsíkjait se vegyük ki a fóliából, a maradék csíkokat, gondosan zárjuk vissza, lehetőség szerint forrasszuk vagy ragasszuk, mivel a tesztsíkokat érő nedvesség jelentős minőségromlást eredményezhet.

A hígított reagenst ne tároljuk, ne használjuk fel későbbi vizsgálathoz!

A különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetők egymással!

ELŐÍRÁS ÉS FIGYELMEZTETÉS:

A készlet némelyik komponense konzerválóként nátrium azidot, tiomersált és antibiotikumot tartalmaz. A kit humán szérumot tartalmazó komponensei Hepatitis B-re, és C-re, ill. HIV1-2-re negatívak, de ettől függetlenül a kontrollokat és a mintákat potenciális biológiai veszélyforrásként kell kezelni és az erre vonatkozó általános laboratóriumi higiénés szabályokat be kell tartani: ne pipettázzuk szájjal, felhasználás közben ne együnk, ne igyunk, ne dohányozzunk, használjunk gumikesztyűt! Vigyázzon, hogy ne történhessen tűszúrás, hámsérülés, vagy nyálkahártyára fröccsenő anyag miatt önfertőződés. Munka után a használt eszközöket a vonatkozó szabályozásoknak megfelelő dekontaminálás után dobjuk el és mossunk kezet!

Különösen ügyeljünk a pipetta hegyek és a hígító edények tisztaságára, a szennyeződött komponensek nem használhatóak fel további mérésekhez. A vegyszer és mosószer maradványok gátolhatják, vagy beindíthatják a reakciót!

Megfelelő eredményt csak az előírások pontos betartása esetén kapunk!

Csak *in vitro* diagnosztikai célra használható, és kizárólag gyakorlott laboratóriumi szakember használhatja!

A VIZSGÁLAT KIVITELEZÉSE:

1. HÍGÍTÁS, ELŐKÉSZÍTÉS:

- Készítsük el az assay tervét, az első mérőhelyeket tartsuk fenn a kontrollok számára.
- Készítsük el a vizsgálathoz szükséges mennyiségű mintahígító és mosópuffer hígítását (1).
- Készítsük el a vizsgálandó minták hígítását (2).

2. MINTA FELVITEL:

- Mérjünk be 100 µl PBS puffert és 100-100 µl-t a negatív, küszöb és pozitív kontroll szérumokból a megfelelő mélyületekbe (3).
- Mérjünk 100-100 µl-t a hígított vizsgálandó szérummintákból a megfelelő sorok további mélyületeibe (3).
- Inkubáljuk a lemez sorait öntapadós fedőlemezzel lezárva 60 percig 37°C-on.

3. KONJUGÁTUM FELVITELE:

- Készítsük el a konjugátum hígítását (4).
- Öntsük ki a lemez mélyületeiből a nem reagált anyagokat és mossuk ki négyszer 250-250 µl mosópufferrel.
- Mérjük 100-100 µl-t a konjugátumból a mélyületekbe.
- Inkubáljuk a lemezeket lefedve 37°C-on 60 percig.

4. SZUBSZTRÁT REAKCIÓ:

- Öntsük ki a lemez mélyületeiből a nem reagált anyagokat és mossuk ki négyszer 250-250 µl mosópufferrel.
- Mérjük a sorok mélyületeibe 100-100 µl TMB szubsztát oldatot.
- Inkubáljuk szobahőmérsékleten, fénytől védve 30 percig.
- Mérjük be a lemez mélyületeibe 100-100 µl 0,25M-os kénsavat, a bemérést követően, a mérés előtt, ajánlatos a lemezt kissé megrezegtetni.

5. MÉRÉS:

- Olvassuk le a fényelnyelési értékeket a kénsav bemérését követő 5 percen belül ELISA fotométeren 450 nm-en levegővel szemben. 630nm-es differenciál szűrő használata ajánlott.

6. ÉRTÉKELÉS:

A vizsgálat értékelhető, ha a PBS puffer oldattal mért $OD_{450} < 0,2$, és a küszöbkontroll TgAE értéke az intermedián (kétes) tartományba esik.

Számítsuk ki a minták relatív transzglutamináz ellenanyag egységét (TgAE) a következő képlettel:

$$TgAE_M = M_{OD450} / NK_{OD450} \times TgAE_{NK}$$

$TgAE_M$ = a minta relatív transzglutamináz ellenanyag egysége
 $TgAE_{NK}$ = a negatív kontroll relatív ellenanyag egysége: 10

M_{OD450} = a minta OD_{450} értéke
 NK_{OD450} = negatív kontroll OD_{450nm} átlaga

A számolt relatív transzglutamináz ellenanyag egysége (TgAE) értéke alapján a minták a következőképpen osztályozhatók:

Negatív: < 15

Kétes: 15-30

Pozitív: > 30

Megjegyzés: Ha a TgAE <10 és a klinikai kép cöliákiára utaló, célszerű az IgA hiányt vizsgálni, ill. gliadin és / vagy transzglutamináz IgG ellenanyag szintet nézni.

Gluten mentes diéta esetén a minták az ellenanyag szint miatt az ún. kétes tartományba kerülnek. Ebben az esetben célszerű a vizsgálatot megismételni a minta 1/100 hígításával, ha az ellenanyag titer értéke nő, a minta gyenge pozitívnak tekinthető (5).

7. Teljesítmény jellemzők:

7.1. Intra-assay:

	n	$OD_{450/630}$ átlag	CV%
1. minta	9	0,298	5,7
2. minta	7	0,803	6,9
3. minta	7	2,256	6,9

7.2. Inter-assay:

	n	$OD_{450/630}$ átlag	CV%
4. minta	5	0,369	8,1
5. minta	5	0,803	9,8
6. minta	5	2,683	9,1

7.3. Specifitás és szenzitivitás:

A vizsgálat során összesen 380 egyént vizsgáltunk. Ebből 120 egyén cöliákiás, 47 dhuringos, 213 egyén pedig negatív volt. A pozitív mintáknál 110 esetben elvégeztük az EMA-IF vizsgálatot is. Az igazolt cöliákiás és dhuringos mintacsoportot kiértékeltek és ROC (receiver operating characters) analízissel állapítottuk meg a cut-off határokat. A specifitás a cöliákiások és a dhuringosok esetében is 99%, a szenzitivitás pedig 90% volt.

Kiegészítések az egyes vizsgálati lépésekhez:

- (1): 1:10 arányú hígítás ionmentes vagy desztillált vízzel.
2 sor használata esetén 5 ml koncentrált hígító és mosópuffert 45 ml desztillált vízzel hígítsunk.
- (2): 1:200 arányú hígítás hígítópufferrel.
A hígítást a következőképpen végezzük: hígítsunk 5µl mintaszérumot a hígítópufferrel 1000µl-re.
- (3): Végezzünk párhuzamos méréseket, a negatív kontroll szérumból legalább hármat.
- (4): 1:200 arányú hígítás a hígítópufferrel.
2 sor használata esetén 10µl tömény konjugátumot hígítunk 2000µl-re.
- (5): Az értékeléskor figyelembe kell venni a vizsgált gyermek étrendjét (diéta) a korábbi klinikai eredményeket és a tünetek súlyosságát.

A címkéken a következő szimbólumok találhatóak



In vitro diagnosztikai használatra



Gyártási szám



Lejáratási idő (év/hónap/nap)



Kódszám



Tárolási hőmérséklet



Biológiai veszély

IRODALOM

- Dieterich, W., et al. (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*, 7, 797.
- Sulkanen, S., et al. (1998) Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 115, 1322.
- M. Sárdy, S. Kárpáti, F. Péterfy, K. Rásky, E. Tomsits, A. Horváth (2000) Comparison of a tissue-transglutaminase ELISA with the endomysium antibody test in the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. *Z. Gastroenterol.* 38, 357