



**Diagnosticum Zrt.**

H-1047 Budapest, Attila u. 126.

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

Fax: +36-1-369-4383

CE

**TG-IgG-Teszt**

ELISA reagenskészlet  
t-transzglutamináz IgG ellenanyagok kimutatása  
humán szérumban.

Kiszerezés: 12 tesztcső, 1x96 vizsgálathoz

Gyári kódszám: 102801

EEKH nyilv. szám: HU/CA01/1986/04

A gluténszenzitív enteropátia egy autoimmun betegség, melyre az intesztinális mukóza krónikus gyulladása jellemző. A glutén érzékenység diagnosztizálására az endomizium (EMA), a gliadin (AGA), a retikulín (ARA) és a szöveti transzglutamináz specifikus IgA szerológiai vizsgálata elfogadott. Számos tanulmány azonban kimutatta, hogy az IgG izotípusú autoantitestek meghatározása is fontos, mivel a glutén érzékeny betegeknél nagyobb arányban fordul elő IgA hiány, mint az egészséges populációban és az IgA hiányos mintákban IgG izotípusú antitestek fordulnak elő. A szöveti transzglutamináz specifikus IgG meghatározása kiegészítő információt ad a diagnosztikai értékűnek tekinthető IgA autoantitest vizsgálat eredményéhez. A TG-IgG-TESZT ELISA készlet egy szilárdfázisú, enzimmel jelzett immundiagnosztikai módszeren alapul, mely a szérumban lévő szöveti transzglutamináz specifikus IgG ellenanyagok kimutatására alkalmas.

#### A KÉSZLET TARTALMA:

t-transzglutamináz antigénnel érzékenyített mikrotitráló lemez	1 db
IgG pozitív kontroll szérum (fehér)	1300 µl
IgG küszöbkontroll szérum (jeltelen)	1300 µl
IgG negatív kontroll szérum (kék)	1500 µl
Anti-humán IgG-HRPO konjugátum (zöld)	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 mikrotitráló lemezen kötött szöveti transzglutamináz antigénnel reagálnak a szérum- vagy plazma mintákban lévő specifikus IgG autoantitestek. Az így képződött immunkomplexek a következő lépésben bemért anti-human IgG-tormaperoxidázzal jelzett ellenanyaggal reagál. Az enzime 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 (TgGE = transzglutamináz ellenanyag egység) alapján.

#### 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 tesztcsíkjait se vegyük ki a fóliából, a maradék csíkokat, gondosan zárjuk vissza, lehetőség szerint forrasszuk, vagy ragasszuk, mivel a tesztcsíkokat érő nedvesség jelentős minőségromlást eredményezhet.

A hígított reagenseket 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 pipetázzuk 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:

- Mérjük be 100 µl PBS puffert és 100-100 µl-t a negatív, küszöb és pozitív kontroll szérumból a megfelelő mélyületekbe (3.).
- Mérjük 100-100 µl-t a hígított vizsgálandó szérumból 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 bemérést 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<sub>450</sub> < 0,2 és a küszöbkontroll TgGE értéke az intermedián (kétes) tartományba esik.

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

$$TgGE_M = M_{OD450} / NK_{OD450} \times TgGE_{NK}$$

TgGE<sub>M</sub> = a minta relatív transzglutamináz ellenanyag egysége

M<sub>OD450</sub> = a minta OD<sub>450</sub> értéke

TgGE<sub>NK</sub> = a negatív kontroll relatív ellenanyag egysége: 10

NK<sub>OD450</sub> = negatív kontroll OD<sub>450nm</sub> átlaga

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

Negatív: < 25

Kétes: 25-40

Pozitív: > 40

## 7. Teljesítmény jellemző:

### 7. 1. Intra-assay:

	n	OD <sub>450/630</sub> átlag	CV%
1. minta	12	0,258	7,5
2. minta	12	1,043	8,7
3. minta	12	3,125	6,7

### 7. 2. Inter-assay:

	n	OD <sub>450/630</sub> átlag	CV%
4. minta	5	0,254	8,7
5. minta	5	1,004	9,2
6. minta	5	2,886	5,0

### 7.3. Specifitás és szenzitivitás:

A vizsgálat során összesen 380 egyént vizsgáltunk. Ebből 120 egyén cöliakiás, 47 dhuringos, 213 egyén pedig negatív volt. A pozitív mintáknál 110 esetben elvégeztük az EMA-IF vizsgálatot is. Az igazolt cöliakiás és dhuringos mintacsoportot kiértékeljük és ROC (receiver operating characters) analízissel állapítottuk meg a cut-off határokat. A specifitás a cöliakiások és a dhuringosok esetében is 98,5%, a szenzitivitás pedig a cöliakiások esetében 20%, a dhuringosok esetében pedig 3%. **Az anti-transzglutamináz IgG vizsgálatnak csak IgA hiány esetén van diagnosztikai jelentősége!**

Relatív specifitás és relatív megegyezés az endomizium vizsgálat (EMA-IgG IF) cöliákis beteg mintákon:

	Relatív specifitás	Relatív egyezés	n
EMA-IgG (IF)	92%	75%	30

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



Lejárati idő (év/hónap/nap)



Kódszám



Tárolási hőmérséklet



Biológiai veszély

## IRODALOM

- Dieterich, W., et al. (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. Nature Medicine, 7, 797.
- Sulkanen, S., et al. (1998) Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked assay in detecting celiac disease. Gastroenterology 115, 1322.
- Prince, H., et al. (2000) Immunglobulin A (IgA) Deficiency and Alternative Celiac Disease-Associated Antibodies in Sera Submitted to a Reference Laboratory for Endomysial IgA Testing. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7, 192.