



**Diagnosticum Zrt.**

H-1047 Budapest, Attila u. 126.

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

Fax: +36-1-369-4383

CE

**re-hu-TG-IgA-Teszt**

ELISA reagenskészlet  
human t-transzglutamináz IgA ellenanyagok kimutatására  
humán szérumban.

Kiszerezés: 12 tesztcsik, 1x96 vizsgálathoz  
Gyári kódszám: 102901  
Engedély száma: HU/CA01/3167/08

#### A KÉSZLET TARTALMA:

r-hu-t-transzglutamináz antigénnel érzékenyített mikrotitráló lemez	1 db
tTG-IgA Ab kalibrátorok (6db.) (piros)	6x 1ml
IgA gyenge pozitív kontroll szérum (rózsaszín)	1ml
IgA negatív kontroll szérum (kék)	1 ml
Anti-humán IgA-HRPO konjugátum (sárga)	100 µl
Tris-EDTA-Tween 20 (TTBS) 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 re-hu-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 rekombináns human t-transzglutamináz antigénnel reagálnak a szérum- vagy plazma mintákban lévő specifikus IgA autoantitestek. Az így képződött immunkomplex a következő lépésben bemért anti-human IgA-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.

A minta specifikus ellenanyag koncentrációja a kalibrációs görbe alapján határozható meg, mely 6db. különböző koncentrációjú tTG-IgA ellenanyagot tartalmazó kalibrátor (hígított humán szérum) segítségével készíthető el. A kit megfelelő működését egy negatív és egy gyenge pozitív kontroll és az ezekre megadott koncentráció (U/ml) alapján ellenőrizhető.

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 tesztcsikjait 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 kalibrátorok és 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 TTBS puffert, 100-100 µl-t a kalibrátorokból, a negatív és a gyenge pozitív kontroll mintákból a megfelelő mélyületekbe(3).
- Mérjük 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 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:

Készítsük el a kalibrációs görbét a kalibrátorokra mért OD450 átlagértékeket (lin) az egyes kalibrátorokra megadott tTG-IgA értékek (log) függvényében:

Kalibrátor 1.	Kalibrátor 2.	Kalibrátor 3.	Kalibrátor 4.	Kalibrátor 5.	Kalibrátor 6.
2,5 U/ml	5 U/ml	10 U/ml	27,5 U/ml	55 U/ml	110 U/ml

A görbe illesztést vagy manuálisan vagy softwer segítségével a leginkább megfelelő görbeillesztési módszert alkalmazva végezzük

A vizsgálat értékelhető, ha a

TTBS puffer oldattal mért OD<sub>450</sub>< 0,2,

és a negatív és gyenge pozitív kontrollra mért t-TgIgA U/ml értékek a megadott tartományba esnek.

A kalibrációs görbe segítségével határozzuk meg a minták t-transzglutamináz IgA ellenanyag egységét (U/ml) és ennek alapján a minták a következő osztályokba sorolhatók:

**Negatív: < 5**

**Gyenge pozitív (kétes): 5-10**

**Pozitív: > 10**

Megjegyzés: Ha a t-Tg-IgA Ab egység <5 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 ellenanyagszint csökkenése miatt az ún. gyenge pozitív (kétes) tartományba kerülnek (5).

### 7. Teljesítmény jellemzők:

#### Precizitás

##### 7.1. Intra-assay:

	n	U/ml átlag	CV%
1. minta	6	1,57	1,8
2. minta	6	16,5	11,9
3. minta	6	35,1	8,2
4. minta	6	49	6,1
5. minta	6	92,9	10,2

##### 7.2. Inter-assay:

	n	U/ml átlag	CV%
6. minta	6	1,6	7,5
7. minta	6	38,3	4,4
8. minta	6	53,1	8,9
9. minta	6	100,7	9,1
10. minta	6	101,3	8,8

**7.3. Analitikai szenzitivitás:** LOQ (quantitation limit): 1,5 U/ml , LOD (detection limit). 0,5U/ml

**7.4. Mérési tartomány:** 1,5-110 U/ml

**7.5. Assay linearitás:** 7db. mintát teszteltünk linearitásra a kalibrációs görbe mérési tartományában, R<sup>2</sup> > 0,98 , az átlag recovery %: 101,2

**7.6. Prozona vizsgálat:** 3db. erősen pozitív mintát teszteltünk 1:6,25 hígításban (assay hígítás 1:100) , fals negatív eredményt nem kaptunk.

##### 7.7. Specifitás és szenzitivitás:

A vizsgálat során összesen 120 egyént vizsgáltunk. Ebből 80 egyén igazoltan cöliákiás, 20db. un. gasztrológiai kontroll és 20db. un. egészséges kontroll. A pozitív mintáknál elvégeztük az EMA-IF vizsgálatot is, 76 esetben pozitív eredményt kaptunk. Az igazolt cöliákiás mintacsoportot kiértékeljük és ROC (receiver operating characters) analízissel állapítottuk meg a cut-off határokat. A diagnosztikai specifitás 98%, a szenzitivitás pedig 95% volt.

Kiegészítések az egyes vizsgálati lépésekhez:

- (1): 1:10 arányú hígítás ionmentes vagy desztillált vízzel.  
4 sor használata esetén 10 ml koncentrált hígító és mosópuffert 90 ml desztillált vízzel hígítsunk.
- (2): 1:100 arányú hígítás hígítópufferrel.  
A hígítást a következőképpen végezzük: hígítsunk 5µl mintaszérumot a hígítópufferrel 500µl-re.
- (3): Végezzünk párhuzamos méréseket.
- (4): 1:500 arányú hígítás a hígítópufferrel.  
4 sor használata esetén 10µl tömény konjugátumot hígítunk 5000µl-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