



ImmLisa™

Celiac tTG

rHuman Tissue Transglutaminase Antibody ELISA

IVD For *in vitro* diagnostic use

PRODUCT INSERT

REF	5144A	Celiac tTG IgA ELISA	96 Determinations
REF	5144G	Celiac tTG IgG ELISA	96 Determinations

INTENDED USE

Enzyme linked immunoassays (ELISA) for the qualitative and semi-quantitative detection of anti-human Tissue Transglutaminase IgA or IgG antibodies in human serum to aid in the diagnosis of gluten sensitive enteropathy / celiac disease (CD) in conjunction with other laboratory and clinical findings.

SUMMARY AND EXPLANATION

Celiac Disease (CD) is an autoimmune gastrointestinal disorder that may occur in genetically susceptible individuals triggered by the ingestion of gluten-containing grains such as wheat, barley and rye. The classical symptoms of CD include diarrhea, weight loss and malnutrition. Only a small percentage of patients with CD presents with classical symptoms. Consequently, the clinical spectrum of CD has grown much broader than in the past to include patients that do not present with classical symptoms. It is not uncommon for the initial symptoms to be non-gastrointestinal or for gastrointestinal symptoms, if present, to be mild or intermittent. The need to examine a wider range of clinical presentation has led to greater numbers of individuals diagnosed with CD later in life than ever before. Adults may present with iron deficiency, macrocytic anemia and hypocalcaemia.

Studies have found the prevalence of CD to be highly variable. If clinical criteria alone are used in determining prevalence, the incidence of CD is much lower as compared with incidence established by serological methods.^{1,2} Using serological methods, recent studies indicate the incidence of CD in the general population to be between one in 100 and one in 500.

Failure to diagnose CD early on may predispose an individual to long-term complications such as splenic atrophy and intestinal lymphoma.^{3,4} A gluten-free diet (GFD) normalizes the mucosa and helps reduce the malignant potential.

Histological examination of the small intestinal biopsy remains the gold standard for diagnosing CD, but it has its own limitations. These include some patients with latent or even active CD that may have normal histopathology.⁵

The revised European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGHAN) criteria include only a single biopsy with clear-cut remission of clinical symptoms on GFD.⁶ Positive serology at the time of diagnosis with disappearance on GFD contributes to the diagnosis. The various serological tests employed in the work-up of patients suspected to have CD include gliadin (AGA), endomysial (EMA), and tissue transglutaminase (tTG) antibody tests. Antibodies to gliadin and tTG are detected by ELISA, whereas EMA are detected by indirect immunofluorescence. EMA are very specific indicators of CD. However, the EMA test is an immunohistochemical method that requires experience in reading immunofluorescence reactions.⁷

Since identification of tTG as the endomysial antigen, ELISA methods have been described for detecting antibodies in the sera of patients with CD. The advantage of the anti-tTG antibody assay is that it is automatable and less subjective than EMA. For this reason, many laboratories have opted to use the tTG antibody method as the screening method. ImmLisa™ Celiac tTG is a unique immunoassay utilizing special chemistry of detecting antibodies to tTG with great degree of specificity and sensitivity and minimizes non-specific antibody detection in other disease controls as has been reported in some other tTG immunoassays.⁸⁻

PRINCIPLES OF PROCEDURE

The test is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with recombinant human Tissue Transglutaminase antigen followed by a blocking step to reduce non-specific binding during the assay run. Controls, calibrators and patient sera are incubated in the antigen coated wells to allow specific antibodies present in the serum to bind to the tTG antigen. Unbound antibodies and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgA or IgG conjugate to the microwells. Unbound conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (TMB) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of TMB substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 450 nm. Results are expressed in ELISA units per milliliter (EU/ml) and reported as positive or negative.

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Reagents are stable until the expiration date when stored and handled as directed.

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use.

Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date.

Coated microwell strips are for one time use only. Unused microwell strips should be carefully resealed in the pouch containing desiccants to prevent condensation and stored at 2-8°C.

Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials.¹²

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.

Materials provided

ImmuLISA™ Celiac tTG IgA ELISA REF 5144A

ImmuLISA™ Celiac tTG IgG ELISA REF 5144G

Kits contains sufficient reagents to perform 96 determinations.











12 x 8	MICROPLATE C tTG	Microplate with individual breakaway microwells. Coated with recombinant human tTG. Ready for use.
1 x 1.75 ml	CONTROL + C tTG-A	Ready to use Positive Control (red cap) for REF 5144A. Contains human serum positive for tTG IgA antibodies. The expected concentration range in EU/ml is printed on the label.
1 x 1.75 ml	CONTROL + C tTG-G	Ready to use Positive Control (red cap) for REF 5144G. Contains human serum positive for tTG IgG antibodies. The expected concentration range in EU/ml is printed on the label.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	Ready to use Negative Control (white cap). Contains human serum.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A C tTG-A	Ready to use set of 5 Calibrators for REF 5144A. Calibrator A (green cap) 160 EU/ml, Calibrator B (violet cap) 80 EU/ml, Calibrator C (blue cap) 40 EU/ml, Calibrator D (yellow cap) 20 EU/ml, and Calibrator E (orange cap) 1 EU/ml. Derived from human serum containing tTG IgA antibodies. Concentrations in EU/ml are printed on the labels.
	CALIBRATOR B C tTG-A	
	CALIBRATOR C C tTG-A	
	CALIBRATOR D C tTG-A	
	CALIBRATOR E C tTG-A	
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A C tTG-G	Ready to use set of 5 Calibrators for REF 5144G. Calibrator A (green cap) 320 EU/ml, Calibrator B (violet cap) 80 EU/ml, Calibrator C (blue cap) 40 EU/ml, Calibrator D (yellow cap) 20 EU/ml, and Calibrator E (orange cap) 1 EU/ml. Derived from human serum
	CALIBRATOR B C tTG-G	
	CALIBRATOR C C tTG-G	

	CALIBRATOR D CtTG-G	containing tTG IgG antibodies. Concentrations in EU/ml are printed on the labels.
	CALIBRATOR E CtTG-G	
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	HRP goat anti-human IgA Conjugate for REF 5144A. Ready for use. Color coded pink.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP goat anti-human IgG Conjugate for REF 5144G. Ready for use. Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL	Serum Diluent. Ready for use. Color coded purple.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	TMB enzyme substrate. Ready for use. Protect from light.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Stop Solution*. Ready for use.
2 x vials	BUF WASH	Powder Wash Buffer. Reconstitute to one liter each.
1 x		Protocol Sheets

Optional Components

1 x 60ml	BUF WASH	Liquid concentrated Wash Buffer. Reconstitute to one liter.
----------	-----------------	--

Symbols used on labels

	Lot number
	Catalog number
	In vitro diagnostic use
	Use by
	Storage temperature
	Consult instructions for use
	Number of tests
	Manufacturer
	Date of Manufacture
	*Danger; Causes severe skin burns and eye damage. Causes severe eye damage. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection. Wash exposed skin thoroughly after handling. If in eyes: rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 450 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples. It is recommended that frozen specimens be tested within one year.

PROCEDURE

Procedural Notes

- Carefully read the product insert before starting the assay.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. It is suggested that reagents be left on the bench out of the box for 30 minutes prior to use. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.
- **Good washing technique is critical.** If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 or 12 wells simultaneously. This speeds the process and provides more uniform incubation times.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.

Test Method

Step 1 Let all reagents and specimens equilibrate to room temperature.

Step 2 Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.

Step 3 For a **qualitative determination** use Calibrator D (*vial with yellow cap*) only.

or

For a **semi-quantitative determination** use Calibrators A through E as depicted in the sample layout below.

Qualitative				Semi-Quantitative			
A	Blank	S5	Etc.	A	Blank	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Step 4 Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **500ul** of Serum Diluent.

Step 5 Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.

Step 6 Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:101**) to the appropriate microwells as per protocol sheet.

Note: Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.

Step 7 Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.

Step 8 Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.

Step 9 Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.

- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 μ l** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 μ l** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within **30 minutes** of adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **450 nm** using a single or at 450/630nm using a dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3 . The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <10 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of Calibrator D must be greater than that of the negative control and less than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations the positive control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{EU/ml of Calibrator D} = \text{EU/ml Test Sample}$$

It is recommended that qualitative results be reported as "positive" or "negative." Sample results greater than or equal to Calibrator D are considered positive.

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot the absorbance of Calibrator A through E against their respective concentrations on linear-log graph paper. Plot the concentrations in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw a point-to-point curve fit. Determine the concentrations of the patient samples from the curve according to corresponding absorbance values. Alternately, a four parameter curve may be used to plot the standard curve.

It is recommended that semi-quantitative results be reported as "positive," "negative," or "indeterminate" with EU/ml unit values. Indeterminate/borderline results should be retested and evaluated along with other laboratory methods, such as assays for detection of EMA and/or Gliadin antibodies.

Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. These values were determined by testing 114 normal blood donors and non-celiac disease control specimens. The mean of the normal subjects plus 2 SD was established as the assay cutoff and assigned an arbitrary value of 20 EU/ml. Each laboratory must determine its own normal values.

anti-tTG Ab value	Interpretation
<20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	Positive

Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing high antibody levels may give absorbance values greater than that of Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values, such specimens should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml values, multiply the units obtained by the dilution factor.

LIMITATIONS OF PROCEDURE

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

Test results serve as an aid in the diagnosis and should be considered in conjunction with other laboratory and clinical findings.

EXPECTED VALUES

Test results in a normal population are usually expected to be negative. However, as the incidence of CD in the normal population is about 1%, some apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive for tTG antibodies.

The incidence and levels of anti-tTG antibodies are dependent upon the diet status. The levels of these antibodies decrease and eventually will become negative in patients with CD who are on a gluten-free diet. Similarly, the levels of these antibodies will increase and may become positive when patients with CD who were on a gluten-free diet ingest a gluten-containing diet.¹³⁻¹⁵ Patients who have CD but are IgA deficient will be positive for IgG antibodies to tTG. In such cases studies can be performed to confirm that the patient is IgA deficient.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the Immulisa™ Celiac tTG ELISAs was evaluated by testing well-characterized EMA positive serum specimens from suspected CD subjects alongside disease controls and “normal” human sera. These specimens were also tested on commercially available ELISA and immunofluorescence test kits. These results are summarized below.

A. Immulisa™ Celiac tTG ELISAs vs. other tTG immunoassay:

		Other tTG IgA ELISA		
		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	74	19	93
CELIAC tTG	Negative	2	90	92
IgA ELISA	Total	76	109	185
Positive Percent Agreement:		97.4% (95% CI 90.0% to 99.5%)		
Negative Percent Agreement:		82.6% (95% CI 73.9% to 88.9%)		
Overall Percent Agreement:		88.6% (95% CI 83.0% to 92.7%)		
EMA Positive Celiac Subjects: 93				
Disease Controls: 31				
Healthy Normal Subjects: 61				

		Other tTG IgG ELISA		
		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	74	21	95
CELIAC tTG	Negative	31	184	215
IgG ELISA	Total	105	205	310
Positive Percent Agreement:		70.5% (95% CI 60.7% to 78.8%)		
Negative Percent Agreement:		89.8% (95% CI 84.6% to 93.4%)		
Overall Percent Agreement:		83.2% (95% CI 78.5% to 87.1%)		

EMA Positive Celiac Subjects: 166

Disease Controls: 53

Healthy Normal Subjects: 91

B. Immulisa™ Celiac tTG ELISAs vs. EMA: Results obtained with the Celiac tTG ELISAs were compared with endomysial antibody (EMA) results obtained using a commercially available IFA and a well-characterized clinical population.

CD population confirmed by EMA

		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	87	6	93
CELIAC tTG	Negative	1	91	92
IgA ELISA	Total	88	97	185
Positive Percent Agreement:		98.9% (95% CI 92.9% to 99.9%)		
Negative Percent Agreement:		93.8% (95% CI 86.5% to 97.5%)		
Overall Percent Agreement:		96.2% (95% CI 92.1% to 98.3%)		

EMA IgA Positive Celiac Subjects: 88

IgA Deficient Celiac Subjects: 5

Disease Controls: 31

Healthy Normal Subjects: 61

CD population confirmed by EMA

		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	72	7	79
CELIAC tTG	Negative	6	191	197
IgG ELISA	Total	78	198	276
Positive Percent Agreement:		92.3% (95% CI 83.4% to 96.8%)		
Negative Percent Agreement:		96.5% (95% CI 92.6% to 98.4%)		
Overall Percent Agreement:		95.3% (95% CI 91.9% to 97.4%)		

EMA Positive Celiac Subjects: 132 (74 EMA IgG Positive)

Disease Controls: 53

Healthy Normal Subjects: 91

C. Clinical Sensitivity and Specificity: Well-characterized CD clinical populations were tested with the Celiac tTG ELISAs producing the following results.

Celiac Disease

		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	88	5	93
CELIAC tTG	Negative	5	87	92
IgA ELISA	Total	93	92	185
Sensitivity:		94.6% (95% CI 87.3% to 98.0%)		
Specificity:		94.6% (95% CI 87.2% to 98.0%)		
Percent Agreement:		94.6% (95% CI 90.0% to 97.2%)		

EMA IgA Positive Celiac Subjects: 88

IgA Deficient Celiac Subjects: 5

Disease Controls: 31

Healthy Normal Subjects: 61

Non-IgA Deficient CD

		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	87	0	87
CELIAC tTG	Negative	1	0	1
IgA ELISA	Total	88	0	88
Sensitivity:		98.9% (95% CI 92.9% to 99.9%)		
Specificity:		NA		
Percent Agreement:		98.9% (95% CI 92.9% to 99.9%)		

EMA IgA Positive Celiac Subjects: 88

Disease Controls: 0

Healthy Normal Subjects: 0

Celiac Disease

		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	72	7	79
CELIAC tTG	Negative	60	137	197
IgG ELISA	Total	132	144	276
Sensitivity:		54.5% (95% CI 45.7% to 63.2%)		
Specificity:		95.1% (95% CI 89.9% to 97.9%)		
Percent Agreement:		75.7% (95% CI 70.1% to 80.6%)		

CD Subjects Confirmed by EMA: 132 (74 EMA IgG Positive)

Disease Controls: 53

Healthy Normal Subjects: 91

IgA Deficient CD

		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	21	0	21
CELIAC tTG	Negative	1	0	1
IgG ELISA	Total	22	0	22
Sensitivity:		95.5% (95% CI 75.1% to 99.8%)		
Specificity:		NA		
Percent Agreement:		95.5% (95% CI 75.1% to 99.8%)		

IgA Deficient CD Subjects: 22

Disease Controls: 0

Healthy Normal Subjects: 0

D. Cross Reactivity: A total of 63 potentially cross-reactive specimens from individuals with other autoimmune disorders or positive for other autoantibodies were tested for tTG antibodies using the Immulisa™ Celiac tTG system.

Condition	n	IgA Positive n (%)	IgG Positive n (%)
Graves Disease	11	0 (0%)	0 (0%)
Hashimoto's Thyroiditis	10	0 (0%)	0 (0%)
ANA positive*	9	0 (0%)	1 (11%)
CCP positive**	10	0 (0%)	0 (0%)
RF positive***	9	0 (0%)	0 (0%)
Ulcerative Colitis	5	0 (0%)	0 (0%)
Crohn's Disease	9	0 (0%)	2 (22%)
Total	63	0 (0%)	3 (5%)

* Antinuclear Antibodies

** Cyclic Citrullinated Peptides Antibodies

*** Rheumatoid Factor Antibodies

Precision

Precision was tested with multiple specimens selected throughout the range of the assay. Three assay runs were performed on different days to determine results between days. An additional run of ten replicates was performed to determine repeatability. Results are summarized below.

Kit	S #	Mean (EU/ml)	Total Imprecision		Between days		Within run (Repeatability)	
			SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
Celiac tTG IgA Assay	1	10.6	1.086	10.2%	1.135	10.7%	1.095	10.2%
	2	20.4	1.224	6.0%	1.476	7.2%	0.956	4.7%
	3	25.0	1.496	6.0%	1.740	6.9%	1.271	5.1%
	4	34.9	2.075	5.9%	2.099	6.1%	2.110	6.0%
	5	48.7	2.634	5.4%	3.661	7.5%	1.090	2.2%
	6	110.6	4.008	3.6%	4.221	3.8%	3.960	3.6%
	7	134.7	7.253	5.4%	8.728	6.5%	5.904	4.4%
	8	183.7	6.161	3.4%	6.606	3.6%	5.615	3.0%
Celiac tTG IgG Assay	1	15.3	1.100	7.2%	1.283	8.3%	0.929	6.1%
	2	24.3	1.727	7.1%	2.101	8.6%	1.355	5.6%
	3	29.8	1.931	6.5%	2.492	8.4%	1.289	4.3%
	4	60.5	3.046	5.0%	3.647	6.0%	2.507	4.1%
	5	99.1	4.720	4.8%	5.687	5.7%	3.756	3.8%
	6	233.7	10.022	4.3%	11.918	5.0%	7.108	3.1%
	7	263.5	13.061	5.0%	14.124	5.4%	11.794	4.4%

Limit of Detection

The limit of detection (LoD) was determined based on 60 replicates of the blank and 10 replicates each of 6 low-level (NHS) samples. LoD for IgA was 4.0 EU/ml. LoD for IgG was 2.9 EU/ml.

Linearity and Recovery

Linearity and recovery were tested by diluting positive specimens through the assay range in equidistant dilutions and comparing actual vs. expected results. The linear range of the assays were determined be 4.0 (LoD) – 160 EU/ml for IgA and 2.9 (LoD) – 260 EU/ml for IgG. Results are summarized below:

Test Range (EU/ml)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R ²	% recovery (obtained/expected)
IgA				
6.0 to 62.7	0.932 (0.879 to 0.985)	0.926 (-1.240 to 3.091)	0.9943	97.9 to 108.3
3.0 to 157.0	0.947 (0.892 to 1.002)	0.999 (-4.347 to 6.345)	0.9979	94.5 to 107.7
3.3 to 163.6	0.910 (0.824 to 0.957)	3.239 (-1.628 to 8.106)	0.9946	85.0 to 109.5
IgG				
3.0 to 41.9	0.987 (0.970 to 1.004)	0.405 (-0.037 to 0.847)	0.9997	93.5 to 101.2
2.7 to 67.6	0.976 (0.839 to 1.112)	4.303 (-0.854 to 9.459)	0.9801	77.6 to 100.1
2.9 to 260.5	0.800 (0.648 to 0.951)	11.6 (-9.4 to 32.6)	0.9693	85.6 to 122.0

Interference

Interference was studied by mixing sera with known tTG antibody levels with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. No significant interference was demonstrated for the following substances at the levels indicated: Hemoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 µmol/L), and Rheumatoid Factor (100 EU/ml).



ImmuliTM

Κοιλιοκάκη tTG

Αντίσωμα ELISA ανθρώπινου ιστού τρανσγλουτινάσης

IVD Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ

REF 5144A Κοιλιοκάκη tTG IgA ELISA 96 Προσδιορισμοί

REF 5144G Κοιλιοκάκη tTG IgG ELISA 96 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Ένζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (ELISA) για την ποιοτική και ημι-ποσοτική ανίχνευση αντισωμάτων IgA IgG στον ιστό τρανσγλουτινάσης στον ανθρώπινο ορό, προκειμένου να βοηθήσει στη διάγνωση εντεροπάθειας από ευαισθησία στη γλουτένη / κοιλιοκάκη (Κ), σε συνδυασμό με άλλα εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα.

ΠΕΡΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΞΗΓΗΣΗ

Η κοιλιοκάκη (Κ) είναι μια αυτοάνοση γαστρεντερική διαταραχή που μπορεί να εμφανιστεί σε γενετικά ευαίσθητα άτομα λόγω της κατάποσης κόκκων που περιέχουν γλουτένη, όπως σιτάρι, κριθάρι και σίκαλη. Τα κλασικά συμπτώματα κοιλιοκάκης περιλαμβάνουν διάρροια, απώλεια βάρους και υποσιτισμό. Μόνο ένα μικρό ποσοστό ασθενών με κοιλιοκάκη παρουσιάζει κλασικά συμπτώματα. Κατά συνέπεια, το κλινικό φάσμα της κοιλιοκάκης έχει αναπτυχθεί πολύ περισσότερο σε σχέση με το παρελθόν για να συμπεριλάβει ασθενείς που δεν παρουσιάζουν κλασικά συμπτώματα. Δεν είναι ασυνήθιστο τα αρχικά συμπτώματα να είναι μη γαστρεντερικά, ή όταν είναι γαστρεντερικά να είναι ήπια ή να παρουσιάζονται σε άστατους ρυθμούς. Η ανάγκη εξέτασης ενός μεγαλύτερου φάσματος κλινικών συμπτωμάτων έχει οδηγήσει στη διάγνωση κοιλιοκάκης σε ένα μεγαλύτερο αριθμό ατόμων μεγαλύτερης ηλικίας, σε σχέση με κάθε άλλη φορά. Οι ενήλικες μπορεί να παρουσιάσουν ανεπάρκεια σιδήρου, μακροκυτταρική αναιμία και υπασβεστιαίμια. Μελέτες έχουν δείξει πως η επικράτηση της κοιλιοκάκης είναι εξαιρετικά μεταβλητή. Εάν τα κλινικά κριτήρια είναι τα μόνα που χρησιμοποιούνται στον καθορισμό της επικράτησης, τότε η επίπτωση της κοιλιοκάκης είναι πολύ μικρότερη εν συγκρίσει με την επίπτωση που καθιερώθηκε με ορολογικές μεθόδους.^{1,2} Με τη χρήση ορολογικών μεθόδων, πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν ότι η επίπτωση της κοιλιοκάκης στο γενικό πληθυσμό είναι περίπου μία στις 100 και μία στις 500.

Εάν η κοιλιοκάκη δεν διαγνωστεί έγκαιρα, μπορεί να προδιαθέσει ένα άτομο σε μακροχρόνιες επιπλοκές, όπως ατροφία του σπλήνα και εντερικό λέμφωμα.^{3,4} Μια δίαιτα που δεν περιέχει γλουτένη ομαλύνει τη βλενογόνο και βοηθά στη μείωση κακοήθους δυναμικού.

Η ιστολογική εξέταση της βιοψίας του λεπτού εντέρου παραμένει ο χρυσός κανόνας για τη διάγνωση της κοιλιοκάκης, αλλά έχει τους δικούς της περιορισμούς. Αυτοί περιλαμβάνουν ορισμένους ασθενείς με λανθάνουσα ή ενεργή κοιλιοκάκη που μπορεί να έχουν φυσιολογική ιστοπαθολογία.⁵

Τα αναθεωρημένα κριτήρια της Ευρωπαϊκής Κοινότητας για Παιδιατρική Γαστρεντολογία και Διατροφή (ESPGAN,) περιλαμβάνουν μόνο μια μεμονωμένη βιοψία με σαφή μείωση των κλινικών συμπτωμάτων σε δίαιτα που δεν περιέχει γλουτένη⁶. Θετική ορολογία τη στιγμή της διάγνωσης χωρίς εμφάνιση στη δίαιτα χωρίς γλουτένη, συμβάλλει στη διάγνωση. Υπάρχουν υποψίες ότι οι διάφορες ορολογικές δοκιμές που χρησιμοποιούνται στις εργασίες παρακολούθησης των ασθενών που έχουν κοιλιοκάκη, περιλαμβάνουν γλιαδίνη (AGA), ενδομύιο (EMA), και τεστ για αντισώματα ιστού τρανσγλουμινάσης (tTG). Αντισώματα στη γλιαδίνη και στην τρανσγλουμινάση ιστού (tTG) ανιχνεύονται από τη μέθοδο ELISA, ενώ τα ενδομυϊκά αντισώματα EMA ανιχνεύονται από έμμεσο ανοσοφθορισμό. Τα EMA είναι πολύ συγκεκριμένοι δείκτες κοιλιοκάκης. Ωστόσο, το τεστ EMA είναι μια ανοσοϊστοχημική μέθοδος που απαιτεί κάποια εμπειρία στην ανίχνευση αντιδράσεων ανοσοφθορισμού.⁷

Από τότε που αναγνώριστηκε το tTG ως το ενδομυϊκό αντιγόνο, οι μέθοδοι ELISA έχουν περιγραφεί ως μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων στον ορό ασθενών με κοιλιοκάκη. Το πλεονέκτημα της χημικής δοκιμής αντισωμάτων αντι-tTG είναι πως είναι αυτοματοποιημένη και λιγότερο υποκειμενική από την EMA. Για το λόγο αυτό, πολλά εργαστήρια έχουν επιλέξει να χρησιμοποιούν τη μέθοδο αντισωμάτων tTG ως τη μέθοδο ανίχνευσης. Η ImmuLisa™ Κοιλιοκάκη tTG είναι μια μοναδική ανοσολογική χημική μέθοδος που χρησιμοποιεί ειδική χημεία ανίχνευσης αντισωμάτων στο TG με μεγάλο βαθμό εξειδίκευσης και ευαισθησίας και ελαχιστοποιεί την ανίχνευση μη ειδικών αντισωμάτων σε άλλους ελέγχους ασθένειας, όπως έχει αναφερθεί σε κάποιες άλλες ανοσολογικές χημικές μεθόδους tTG.⁸⁻¹¹

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Το τεστ αυτό πραγματοποιείται ως μια στερεά φάση ανοσολογικής χημικής δοκιμής. Οι μικροκοιλότητες είναι επικαλυμμένες με αντιγόνο τρανσγλουτινάσης ανθρώπινου ιστού, ακολουθούμενο από ένα βήμα για τη μείωση μη ειδικής δέσμησης κατά τη διάρκεια της χημικής δοκιμής. Έλεγχοι μετρητές και οροί ασθενούς επωάζονται στους επικαλυμμένους με αντιγόνο τοίχους, προκειμένου να επιτρέψουν στα ειδικά αντισώματα που είναι παρόντα στον ορό να συνδεθούν με το αντιγόνο tTG. Μη συνδεδεμένα αντισώματα και άλλες πρωτεΐνες ορού έχουν απομακρυνθεί με το πλύσιμο των μικροκοιλοτήτων. Τα συνδεδεμένα αντισώματα ανιχνεύονται με την προσθήκη ενός ενζύμου που χαρακτηρίζεται ως αντι-ανθρώπινο IgA ή IgG συζευγμένο με τις μικροκοιλότητες. Το δε ασύνδετο, αφαιρείται με το πλύσιμο. Στη συνέχεια, υπόστρωμα ειδικού ενζύμου (TMB) προστίθεται στη συνέχεια στα φρέατα και η παρουσία αντισωμάτων ανιχνεύεται από μια αλλαγή χρώματος που παράγεται από τη μετατροπή του υποστρώματος TMB, σε ένα προϊόν έγχρωμης αντίδρασης. Η αντίδραση διακόπτεται και η ένταση τη χρωματικής αλλαγής, η οποία είναι ανάλογη της περιεκτικότητας των αντισωμάτων, διαβάζεται από φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml) και αναφέρονται ως θετικά ή αρνητικά.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αποθήκευση και Προετοιμασία

Αποθηκεύστε όλα τα αντιδραστήρια στους 2-8°C. **Μην καταψύχετε.** Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης όταν αποθηκεύονται και μεταχειρίζονται σύμφωνα με την καθοδήγηση.

Μην χρησιμοποιείτε αν το αντιδραστήριο δεν είναι διαυγές ή υπάρχει ένζυμο παρόν. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν τη χρήση.

Ανασυνθέστε το διάλυμα πλύσης στο 1 λίτρο με απεσταγμένο ή απιοντισμένο νερό. Όταν αποθηκεύεται στους 2-8°C, το ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης του kit.

Οι λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων προορίζονται για χρήση μιας μόνο φοράς. Οι μη χρησιμοποιηθείσες λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων θα πρέπει να επανασφραγίζονται προσεκτικά στη σακούλα που περιέχει αποξηραντικές ουσίες για να αποφευχθεί υγραποίηση και να αποθηκεύονται στους 2-8°C.

Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά που παράγονται από τους ανθρώπους και χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για HBsAg, HCV, HIV-1 και 2 και HTLV-I και βρέθηκαν αρνητικά από απαιτούμενα τεστ FDA. Ωστός, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα των ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικώς μολυσματικά. Ακολουθήστε καλές εργαστηριακές πρακτικές αναφορικά με την αποθήκευση, τη παράδοση και τη διάθεση των υλικών αυτών.¹²

Οι οδηγίες θα πρέπει να ακολουθούνται ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο kit, προκειμένου να διασφαλιστούν έγκυρα αποτελέσματα. Μην ανταλλάσσετε τα στοιχεία του kit με αυτά από άλλες πηγές. Ακολουθήστε καλές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιήσετε τη μικροβιακή και την αλληλομόλυνση των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό. Μην χρησιμοποιείτε εξαρτήματα kit μετά την ημερομηνία λήξης στις ετικέτες.

Παρεχόμενα υλικά

ImmuLisa™ Κοιλιοκάκη tTG IgA ELISA

REF 5144A

ImmuLisa™ ΚοιλιοκάκηTG IgG ELISA

REF 5144G

Τα kit περιλαμβάνουν επαρκή αντιδραστήρια για να εκτελέσουν 96 προσδιορισμούς.

12 x 8

MICROPLATE|CITG









Μικρόπλακα με μεμονωμένες αποσχιστικές
μικροκοιλότητες. Επικαλυμμένη με
ανασυνδυσμένη ανθρώπινη ιστική

1 x 1.75 ml	CONTROL+ C tTG-A	τρανσγλουταμινάση (tTG). Έτοιμη για χρήση. Έτοιμο για χρήση Θετικού Ελέγχου (κόκκινο καπάκι) για REF 5144A. Περιέχει ανθρώπινο ορό για αντισώματα tTG IgA. Το αναμενόμενο εύρος περιεκτικότητας σε EU/ml αναγράφεται στην ετικέτα.
1 x 1.75 ml	CONTROL+ C tTG-G	Έτοιμο να χρήση Θετικού Ελέγχου (κόκκινο καπάκι) για REF 5144G. Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα tTG IgG. Το αναμενόμενο εύρος περιεκτικότητας σε EU/ml αναγράφεται στην ετικέτα.
1 x 1.75 ml	CONTROL-	Έτοιμο για χρήση Αρνητικού Ελέγχου (λευκό καπάκι). Περιέχει ανθρώπινο ορό.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A C tTG-A CALIBRATOR B C tTG-A CALIBRATOR C C tTG-A CALIBRATOR D C tTG-A CALIBRATOR E C tTG-A	Έτοιμο για χρήση σετ 5 Μετρητών για REF 5144A. Μετρητής A (πράσινο καπάκι) 160 EU/ml, Μετρητής B (βιολετί καπάκι) 80 EU/ml, Μετρητής C (μπλέ καπάκι) 40 EU/ml, Μετρητής D (κίτρινο καπάκι) 20 EU/ml και Μετρητής E (πορτοκαλί καπάκι) 1 EU/ml. Παράγεται από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα tTG IgA. Οι περιεκτικότητες σε EU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A C tTG-G CALIBRATOR B C tTG-G CALIBRATOR C C tTG-G CALIBRATOR D C tTG-G CALIBRATOR E C tTG-G	Έτοιμο για χρήση σετ 5 Μετρητών REF 5144G. Μετρητής A (πράσινο καπάκι) 320 EU/ml, Μετρητής B (βιολετί καπάκι) 80 EU/ml, Μετρητής C (μπλε καπάκι) 40 EU/ml, Μετρητής D (κίτρινο καπάκι) 20 EU/ml, και Μετρητής E (πορτοκαλί καπάκι) 1 EU/ml. Παραγόμενο από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα tTG IgG. Οι περιεκτικότητες σε EU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	HRP συζυγές αντί -ανθρώπινο IgA κασίκας για REF 5144A. Έτοιμο για χρήση.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP συζυγές αντι-ανθρώπινο IgG κασίκας για REF 5144G. Έτοιμο για χρήση.
1 x 60 ml	DIL	Αραιωτικός ορός. Έτοιμο για χρήση. Κωδικοποιημένο πορφυρό χρώμα.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Υπόστρωμα ενζύμου TMB. Έτοιμο για χρήση Να προστατεύεται από το φως.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Διακόψτε το διάλυμα *. Έτοιμο για χρήση.
2 x	BUF WASH	Σκόνη Πλύσης. Προχωρήστε σε ανασύσταση για κάθε ένα λίτρο.
1 x		Φύλλα Πρωτοκόλλου

Προαιρετικά Συστατικά

1 x 60ml	BUF WASH	Υγρό Συμπυκνωμένο Διάλυμα Πλύσης. Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο.
----------	-----------------	--

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται σε ετικέτες

	Αριθμός Παρτίδας
	Αριθμός καταλόγου
	Διαγνωστική χρήση in vitro
	Χρήση έως
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Αριθμός δοκιμών
	Κατασκευαστής



Ημερομηνία κατασκευής



*Κίνδυνος. Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Πλύνετε σχολαστικά μετά το χειρισμό. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια / πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ (ή με τα μαλλιά): Βγάλτε αμέσως όλα τα μολυσμένα ρούχα. Ξεπλύνετε την επιδερμίδα με νερό/στο ντους. Εάν δεν υποχωρεί ο οφθαλμικός ερεθισμός: Συμβουλευθείτε / Επισκεφθείτε γιατρό

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Πιέστε το μπουκάλι για να διατηρήσετε το αραιωμένο διάλυμα πλύσης
- Πιπέτες ικανές να αποδώσουν 5 μl ως και 1000 μl
- Διαθέσιμα στόμια πιπετών
- Καθαρίστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες 12 x 75 mm και δοκιμάστε το ράφι των σωλήνων
- Χρονόμετρο
- Απορροφητικό χαρτί κουζίνας
- Αναγνώστης μικροπλακών ικανός να αναγνώσει τις τιμές απορρόφησης στα 450 nm. Εάν είναι διαθέσιμος ο αναγνώστης μικροπλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm
- Αυτόματο πλυντήριο μικροπλακών που μπορεί να παρέχει 200 ml

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μόνον δείγματα ορού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σ' αυτήν τη διαδικασία. Αιμολυμένα, λιπαιμικά ή βακτηριδιακά επιμολυσμένα δείγματα μπορούν να παρεμβληθούν στην εκτέλεση της δοκιμασίας και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα δεν θα πρέπει να φυλάσσονται για παραπάνω από μία εβδομάδα στους 2°- 8°C. Για αποθήκευση μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγετε επανειλημμένη απόψυξη και νέα ψύξη των δειγμάτων. Συνιστάται τα κατεψυγμένα δείγματα να υποβάλλονται σε έλεγχο εντός ενός έτους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις διαδικασίας

- Διαβάστε προσεκτικά το ένθεμα του προϊόντος πριν να ξεκινήσετε τη χημική δοκιμή.
- Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών θα πρέπει να προετοιμαστούν πριν την έναρξη της χημικής δοκιμής.
- Αφήστε τα δείγματα των ασθενών και ισορροπήστε τα αντιδραστήρια δοκιμών σε θερμοκρασία δωματίου πριν να ξεκινήσετε με τη πειραματική διαδικασία. Συνιστάται να μένουν τα αντιδραστήρια στον πάγκο έξω από το κουτί για 30 λεπτά πριν τη χρήση. Επιστρέψτε όλα τα αχρησιμοποιητά δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση.
- Αφαιρέστε τις απαιτούμενες ταινίες μικροκοιλοτήτων από τη θήκη και προσεκτικά επανασφραγίστε τη θήκη για να αποφύγετε τη συμπύκνωση στα αχρησιμοποιητά φρεάτια. Επιστρέψτε τη θήκη αμέσως στο ψυγείο.
- **Η τεχνική καλής πλύσης είναι πολύ σημαντική** Εάν το πλύσιμο γίνεται στο χέρι, το κατάλληλο πλύσιμο επιτυγχάνεται με την κατεύθυνση μιας δυναμικής ροής ενός διαλύματος πλύσης με φαρδύ στόμιο σε όλη τη μικρόπλακα. **Συνιστάται ένα αυτοματοποιημένο πλυντήριο μικρόπλακας.**
- Χρησιμοποιήστε ένα σιφώνι πολλών διαύλων, ικανό να παράσχει 8 ή 12 φρεάτια ταυτόχρονα. Αυτό επιταχύνει τη διαδικασία και παρέχει μια πιο ομοιόμορφη περίοδο επώασης.
- Για όλα τα βήματα, ο προσεκτικός έλεγχος του χρόνου είναι σημαντικός. Η έναρξη όλων των περιόδων επώασης ξεκινά με τη συμπλήρωση της προσθήκης του αντιδραστηρίου.
- Προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων θα πρέπει να πραγματοποιείται στον ίδιο ρυθμό και σειρά.

Μέθοδος δοκιμασίας

- Βήμα 1** Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 2** Επιγράψτε το φύλλο πρωτοκόλλου για να υποδηλώσετε την τοποθέτηση του δείγματος στα φρεάτια. Είναι ορθή εργαστηριακή πρακτική η εκτέλεση δειγμάτων εις διπλούν
- Βήμα 3** Για ένα ποιοτικό **προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο τον Μετρητή D φιαλίδιο με κίτρινο καπάκι) .

ή

Για ένα **ημί-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τους μετρητές A ως και E όπως απεικονίζεται στο σχεδιάγραμμα δείγματος παρακάτω.

Ποιοτικός				Ημι-Ποσοτικός			
A	Κενός	S5	Κ.λπ.	A	Κενός	S1	Κ.λπ.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- Βήμα 4** Ετοιμάστε μια διάλυση **1:101** δειγμάτων των ασθενών ανακατεύοντας **5 μl** του ορού του ασθενούς με **500ul** διαλύτη του ορού.
- Βήμα 5** Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκοιλότητες από τη θήκη και επιστρέψτε τις αχρησιμοποίητες ταινίες στη σφραγισμένη θήκη στο ψυγείο. Τοποθετήστε με ασφάλεια τις μικροκοιλότητες στον έξτρα παρεχόμενο κάτοχο.
- Βήμα 6** Πιπέτα **100 μl** με μετρητές έτοιμους προς χρήση, θετικούς και αρνητικούς ελέγχους και αραιωμένα δείγματα ασθενών (**1:101**) στις κατάλληλες μικροκοιλότητες, σύμφωνα με το φύλλο πρωτοκόλου.
Σημείωση: Συμπεριλάβετε ένα φρεάτιο το οποίο περιέχει **100 μl** του διαλύτη ορού, ως τυφλό αντιδραστήριο. Μηδενίστε τον αναγνώστη ELISA έναντι του τυφλού αντιδραστήριου.
- Βήμα 7** Επώαστε **30 λεπτά** (± 5 min) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 8** Πλύνετε **4x**με διάλυμα πλύσης. Για πλύσιμο στο χέρι, γεμίστε κάθε μικροκοιλότητα με διάλυμα πλύσης που έχει ανασυσταθεί. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας και ακουμπώντας τα περιεχόμενα κάθε φρεατίου, ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε φρεάτιο. Για να στιγματίσετε το τέλος κάθε πλυσίματος, αναστρέψτε τις ταινίες και ακουμπήστε τα φρεάτια σθεναρά σε απορροφητικό χαρτί κουζίνας. Για αυτόματα πλυντήρια, προγραμματίστε το πλυντήριο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Πιπέτα **100 μl** του συζευγές σε μικροκοιλότητες.
- Βήμα 10** Επώαστε **30 minutes** (± 5 min) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 11** Πλύνετε όλες τις μικροκοιλότητες όπως στο βήμα 8.
- Βήμα 12** Πιπέτα **100 μl** από υπόστρωμα ενζύμου σε κάθε μικροκοιλότητα σε κάθε σειρά και χρόνο όπως ισχύει για το συζευγές.
- Βήμα 13** Επώαστε **30 minutes** (± 5 min) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 14** Πιπέτα **100 μl** με διάλυμα σε κάθε μικροκοιλότητα χρησιμοποιώντας την ίδια σειρά και χρόνο όπως και με την προσθήκη του υποστρώματος ενζύμου. Διαβάστε τις τιμές απορρόφησης εντός **30 λεπτών** από την προσθήκη του διαλύματος.
- Βήμα 15** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε μικροκοιλότητας στα **450 nm** χρησιμοποιώντας μια μεμονωμένη μικροκοιλότητα ή στα **450/630nm** χρησιμοποιώντας έναν αναγνώστη μικροπλακιδίων διπλού μήκους κύματος έναντι του τυφλού αντιδραστήριου, σε ρύθμιση μηδενικής απορρόφησης.

Ποιοτικός έλεγχος

Οι μετρητές, οι θετικοί και οι αρνητικοί έλεγχοι και ένα τυφλό αντιδραστήριο θα πρέπει να αναλύονται με κάθε χημική δοκιμή, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της δοκιμασίας. Η ανάγνωση της απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου θα πρέπει να είναι <0.3 . Ο μετρητής A θα πρέπει να έχει μια ανάγνωση απορρόφησης, όχι λιγότερη από 1.0, αλλιώς η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί. Ο αρνητικός έλεγχος θα πρέπει να είναι <10 ΕΕ/ml. Εάν η δοκιμασία που θα διεξαχθεί θα είναι εις διπλούν, ο μέσος όρος των δυο αναγνώσεων θα πρέπει να ληφθεί προκειμένου να προσδιοριστεί το ΕU/ml. Κατά την εκτέλεση

ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του μετρητή D θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτή του αρνητικού ελέγχου και λιγότερη από την απορροφητικότητα του θετικού ελέγχου. Για ημί-ποσοτικό προσδιορισμό, ο θετικός έλεγχος θα πρέπει να δίνει τιμές στο εύρος που αναφέρεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι περιεκτικότητες των δειγμάτων ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

$$\frac{\text{Abs. δείγμα δοκιμασίας}}{\text{Abs. του μετρητή D}} \times \text{EU/ml του μετρητή D} = \text{EU/ml δείγμα δοκιμασίας}$$

Συνιστάται τα ποιοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά” ή “αρνητικά.” Τα αποτελέσματα δειγμάτων που είναι μεγαλύτερα από ή ίσα με τον Βαθμονομητή Δ θεωρούνται θετικά.

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Σχεδιάστε την απορρόφηση του μετρητή A ως E έναντι των αντιστοίχων περιεκτικότητων τους στο γραμμικό διάγραμμα. Σχεδιάστε τις περιεκτικότητες σε EU/ml στον άξονα X, έναντι της απορροφητικότητας στον άξονα Y και σχεδιάστε από σημείο σε σημείο μια καμπύλη που να ταιριάζει. Προσδιορίστε τις περιεκτικότητες των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σύμφωνα με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης. Εναλλακτικά, μια καμπύλη τεσσάρων παραμέτρων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να σχεδιαστεί η κανονική καμπύλη.

Συνιστάται τα ημι-ποσοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά,” “αρνητικά,” ή “απροσδιόριστα” με τιμές μονάδας EU/ml. Τα απροσδιόριστα/οριακά αποτελέσματα θα πρέπει να επανελέγονται και αξιολογούνται μαζί με άλλες εργαστηριακές μεθόδους.

Ερμηνεία

Οι τιμές ερμηνείας είχαν καθοριστεί από τη δοκιμή 114 φυσιολογικών δοτών αίματος και δείγματα ελέγχου κοιλιάκης. Ο μέσος όρος των φυσιολογικών ατόμων συν 2 SD καθιερώθηκε ως η δοκιμασία αποκοπής και της αποδόθηκε μια αυθαίρετη τιμή 20 EU/ml. IMMCO προτείνει τη ρήση του εύρους αναφορών παρακάτω. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να επικυρώνει τις τιμές δοκιμασίας για τις δικές τους όρους.

Αντι-τιμή-tTG Ab	Ερμηνεία
<20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Απροσδιόριστο (Οριακό)
>25 EU/ml	θετικό

Μετρητής

Οι μετρητές που είναι έτοιμοι για χρήση, περιλαμβάνονται για να παράσχουν ακριβή ημί-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται με κάθε εκτέλεση. Δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων μπορεί να δώσουν τιμές απορρόφησης μεγαλύτερες από αυτή του μετρητή Α. Για προσδιορισμό σωστών ημι-ποσοτικών τιμών, τέτοια δείγματα θα πρέπει να αραιώνονται περαιτέρω, έτσι ώστε να εμπίπτουν στο εύρος της καμπύλης του μετρητή, όταν γίνει επανεξέταση. Για τον προσδιορισμό των τιμών EU/ml πολλαπλασιάστε τις μονάδες που λαμβάνονται από τον παράγοντα αραιώσης.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Μόνο τα δείγματα ορού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε αυτή τη διαδικασία. Χονδροειδώς αιμολυμένα, λιπαιμικά ή μικροβιακά μολυσμένα δείγματα, μπορεί να επηρεάσουν την εκτέλεση της δοκιμής και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν. Αποθηκεύστε τα δείγματα στους 2°- 8°C, όχι για περισσότερο από μια εβδομάδα. Για μεγαλύτερο διάστημα αποθήκευσης, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψυχθούν. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και την απόψυξη των δειγμάτων.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Τα αποτελέσματα των δοκιμών σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό συνήθως αναμένεται να είναι αρνητικά. Ωστόσο, καθώς η συχνότητα εμφάνισης της κοιλιοκάκης σε φυσιολογικό πληθυσμό ανέρχεται περίπου στο 1%, ορισμένα φαινμενικά υγιή, ασυμπτωματικά άτομα, μπορεί να φανούν θετικά στα αντισώματα tTG.

Η συχνότητα και τα επίπεδα των αντισωμάτων αντί-tTG εξαρτώνται από την κατάσταση της διαίτας. Τα επίπεδα των αντισωμάτων αυτών μειώνονται και τελικά θα γίνουν αρνητικά σε ασθενείς με κοιλιοκάκη, που είναι σε διαίτα χωρίς γλουτένη. Κατά τον ίδιο τρόπο, τα επίπεδα των αντισωμάτων αυτών θα αυξηθούν και μπορεί να γίνουν θετικά όταν ασθενείς με κοιλιοκάκη, που ακολουθούσαν διαίτα χωρίς γλουτένη, αρχίσουν να ακολουθούν διαίτα που περιέχει γλουτένη.¹³⁻¹⁵ Ασθενείς που έχουν κοιλιοκάκη αλλά έχουν ανεπάρκεια σε IgA θα είναι θετικοί για αντισώματα IgG ως και tTG. Σε τέτοιες περιπτώσεις, θα διεξαχθούν μελέτες για να επιβεβαιώσουν ότι ο ασθενής έχει ανεπάρκεια σε IgA

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα της ImmuLisa™ Κοιλιοκάκης TG ELISAs αξιολογήθηκε από τη δοκιμή καλοχαρακτηρισμένων δειγμάτων ορού EMA από άτομα που είναι ύποπτα για κοιλιοκάκη, παράλληλα με ελέγχους ασθενειών και « φυσιολογικό» ανθρώπινο ορό. Αυτά τα δείγματα δοκιμάστηκαν επίσης σε διαθέσιμες στο εμπόριο ELISA και σε kit δοκιμών ανοσοφθορισμού. Τα αποτελέσματα αυτά περιγράφονται περιληπτικά παρακάτω:

A. ImmuLisa™ Κοιλιοκάκη tTG ELISAs συγκριτικά με άλλες ανοσολογικές χημικές δοκιμές:

Άλλες tTG IgA ELISA

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	74	19	93
ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ tTG	Αρνητικό	2	90	92
IgA ELISA	Σύνολο	76	109	185

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 97,4% (95% CI 90,0% - 99,5%)

Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 82,6% (95% CI 73,9% - 88,9%)

Συνολικό Ποσοστό Συμφωνίας: 88,6% (95% CI 83,0% - 92,7%)

Άτομα Θετικής Κοιλιοκάκης EMA: 93

Έλεγχοι Ασθενειών: 31

Υγιή Φυσιολογικά Άτομα: 61

Άλλα tTG IgG ELISA

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	74	21	95
ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ tTG	Αρνητικό	31	184	215
IgG ELISA	Σύνολο	105	205	310

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 70,5% (95% CI 60,7% - 78,8%)

Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 89,8% (95% CI 84,6% - 93,4%)

Συνολικό Ποσοστό Συμφωνίας: 83,2% (95% CI 78,5% - 87,1%)

Άτομα Θετικής Κοιλιοκάκης EMA: 166

Έλεγχοι Ασθενειών : 53

Υγιή Φυσιολογικά Άτομα: 91

B. ImmuLisa™ Κοιλιοκάκη tTG ELISAs vs. EMA: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν με την ΚοιλιοκάκηTG ELISAs συγκρίθηκαν με αποτελέσματα ενδομυϊκών αντισωμάτων (EMA) που λήφθηκαν με τη χρήση εμπορική διαθέσιμης IFA και καλόχαρακτηρισμένου κλινικού πληθυσμού.

Πληθυσμός Κοιλιοκάκης επιβεβαιωμένος EMA

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	87	6	93
ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ tTG	Αρνητικό	1	91	92
IgA ELISA	Σύνολο	88	97	185

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 98,9% (95% CI 92,9% - 99,9%)

Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 93,8% (95% CI 86,5% - 97,5%)

Συνολικό Ποσοστό Συμφωνίας: 96,2% (95% CI 92,1% - 98,3%)

Άτομα Θετικής Κοιλιοκάκης EMA IgA: 88

Ανεπαρκή Ανοσοσφαιρίνης (IgA) Υποκείμενα Κοιλιοκάκης: 5

Έλεγχοι Ασθενειών: 31

Υγιή Φυσιολογικά Άτομα: 61

Πληθυσμός Κοιλιοκάκης Επιβεβαιωμένος EMA

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	72	7	79
ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ tTG	Αρνητικό	6	191	197
IgG ELISA	Σύνολο	78	198	276

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 92,3% (95% CI 83,4% - 96,8%)

Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 96,5% (95% CI 92,6% - 98,4%)

Συνολικό Ποσοστό Συμφωνίας: 95,3% (95% CI 91,9% - 97,4%)

Άτομα Θετικής Κοιλιοκάκης EMA: 132

Άτομα Θετικής Κοιλιοκάκης EMA IgG: 74

Ελέγχοι Ασθενειών: 53

Υγιή Φυσιολογικά Άτομα: 91

C. Κλινική Ευαισθησία και Ιδιαιτερότητα: Καλώς χαρακτηρισμένοι με CD κλινικοί πληθυσμοί υπεβλήθησαν σε δοκιμή με τις μεθόδους ELISA με tTG για Κοιλιοκάκη παρουσιάζοντας τα ακόλουθα αποτελέσματα.

Νόσος Κοιλιοκάκης

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	88	5	93
ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ tTG	Αρνητικό	5	87	92
IgA ELISA	Σύνολο	93	92	185

Εκτιμώμενη Ευαισθησία: 94,6% (95% CI 87,3% - 98,0%)

Εκτιμώμενη Ειδικότητα: 94,6% (95% CI 87,2% - 98,0%)

Συμφωνία: 94,6% (95% CI 90,0% - 97,2%)

Θετικά σε αντισώματα έναντι ενδομυσίου (EMA) IgA Υποκείμενα Κοιλιοκάκης: 88

Ανεπαρκή Ανοσοσφαιρίνης (IgA) Υποκείμενα Κοιλιοκάκης: 5

Ελέγχοι Ασθενειών: 31

Υγιή Φυσιολογικά Άτομα: 61

CD Μη Ανεπαρκές Ανοσοσφαιρίνης (IgA)

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	87	0	87
ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ tTG	Αρνητικό	1	0	1
IgA ELISA	Σύνολο	88	0	88

Εκτιμώμενη Ευαισθησία: 98,9% (95% CI 92,9% - 99,9%)

Εκτιμώμενη Ειδικότητα: --

Συμφωνία: 98,9% (95% CI 92,9% - 99,9%)

Άτομα Θετικής Κοιλιοκάκης EMA IgA: 88

Ελέγχοι Ασθενειών: 0

Υγιή Φυσιολογικά Άτομα: 0

Νόσος Κοιλιοκάκης

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	72	7	79
ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ tTG	Αρνητικό	60	137	197
IgG ELISA	Σύνολο	132	144	276

Εκτιμώμενη Ευαισθησία: 54,5% (95% CI 45,7% - 63,2%)

Εκτιμώμενη Ειδικότητα: 95,1% (95% CI 89,9% - 97,9%)

Συμφωνία: 75,7% (95% CI 70,1% - 80,6%)

Άτομα Θετικής Κοιλιοκάκης EMA: 132 (74 Άτομα Θετικής Κοιλιοκάκης EMA IgG)

Ελέγχοι Ασθενειών: 53

Υγιή Φυσιολογικά Άτομα: 91

CD Ανεπαρκές Ανοσοσφαιρίνης (IgA)

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	21	0	21
ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ tTG	Αρνητικό	1	0	1
IgG ELISA	Σύνολο	22	0	22

Εκτιμώμενη Ευαισθησία: 95,5% (95% CI 75,1% - 99,8%)

Εκτιμώμενη Ειδικότητα: --

Συμφωνία: 95,5% (95% CI 75,1% - 99,8%)

Ανεπαρκή Ανοσοσφαιρίνης (IgA) Υποκείμενα CD: 22

Ελέγχοι Ασθενειών: 0

Υγιή Φυσιολογικά Άτομα: 0

D. διασταυρούμενη αντίδραση: Ένα σύνολο 63 δυναμικών διασταυρούμενων-αντιδρώντων ειδών από άτομα με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές ή θετικό αποτέλεσμα για άλλα αυτοαντισώματα υπεβλήθησαν σε τεστ για αντισώματα tTG με τη χρήση του συστήματος ImmuLISA™ Κοιλιοκάκη tTG.

Κατάσταση	n	IgA Θετικό	IgG Θετικό
		n (%)	n (%)
Ασθένεια Graves	11	0 (0%)	0 (0%)
Θυροειδίτιδα του Hashimoto's	10	0 (0%)	0 (0%)
ANA θετικά*	9	0 (0%)	1 (11%)
CCP θετικά**	10	0 (0%)	0 (0%)
RF θετικά***	9	0 (0%)	0 (0%)
Ελκώδης κολίτιδα	5	0 (0%)	0 (0%)
Ασθένεια του Crohn's	9	0 (0%)	2 (22%)
Σύνολο	63	0 (0%)	3 (5%)

* Ανιπυρηνικά Αντισώματα

** Αντισώματα Κυκλικών Πεπτιδίων

*** Αντισώματα Ρευματοειδή Παράγοντα

Ακρίβεια

Δοκιμάστηκε ακρίβεια με πολλαπλά δείγματα που επιλέχθηκαν σε όλο το εύρος της χημικής δοκιμής. Τρεις χημικές δοκιμές διεξήχθησαν σε διαφορετικές μέρες, προκειμένου να προσδιοριστούν τα αποτελέσματα μεταξύ των ημερών. Δέκα επιπρόσθετες επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν, προκειμένου να προσδιοριστεί η επαναληψιμότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται περιληπτικά παρακάτω:

Kit	S #	Τρόπος (EU/ml)	Σύνολο ανακρίβειας		Μεταξύ ημερών		Εντός επαναλήψας	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	
Χημ.Δοκ tTG IgA	1	10,6	1,086	10,2%	1,135	10,7%	1,095	10,2%
	2	20,4	1,224	6,0%	1,476	7,2%	0,956	4,7%
	3	25,0	1,496	6,0%	1,740	6,9%	1,271	5,1%
	4	34,9	2,075	5,9%	2,099	6,1%	2,110	6,0%
	5	48,7	2,634	5,4%	3,661	7,5%	1,090	2,2%
	6	110,6	4,008	3,6%	4,221	3,8%	3,960	3,6%
	7	134,7	7,253	5,4%	8,728	6,5%	5,904	4,4%
	8	183,7	6,161	3,4%	6,606	3,6%	5,615	3,0%
Χημ.Δοκ tTG IgG	1	15,3	1,100	7,2%	1,283	8,3%	0,929	6,1%
	2	24,3	1,727	7,1%	2,101	8,6%	1,355	5,6%

3	29,8	1,931	6,5%	2,492	8,4%	1,289	4,3%
4	60,5	3,046	5,0%	3,647	6,0%	2,507	4,1%
5	99,1	4,720	4,8%	5,687	5,7%	3,756	3,8%
6	233,7	10,022	4,3%	11,918	5,0%	7,108	3,1%
7	263,5	13,061	5,0%	14,124	5,4%	11,794	4,4%

Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (LoD) προσδιορίστηκε βάσει 60 επαναλήψεων του τυφλού αντιδραστηρίου και 10 επαναλήψεις για καθένα από τα δείγματα (NHS) 6 χαμηλών επιπέδων. Το LoD για το IgA ήταν 4,0 EU/ml και για το IgG ήταν 2,9 EU/ml.

Γραμμικότητα και ανάρρωση

Η γραμμικότητα και η ανάρρωση δοκιμάστηκαν με την αραίωση θετικών δειγμάτων μέσω του εύρους της χημικής δοκιμής σε ισόποσες διαλύσεις και συγκρίνοντας τα πραγματικά με τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Το γραμμικό εύρος των χημικών δοκιμών προσδιορίστηκε στο (LoD) – 160 EU/ml για το IgA και 2,9 (LoD) – 260 EU/ml για το IgG. Τα αποτελέσματα αναφέρονται περιληπτικά παρακάτω:

Δοκιμή Εύρους (EU/ml)	Κλίση (95% CI)	Υ-διακοπή (95% CI)	R ²	% ανάρρωση (πραγματική/αναμενόμενη)
IgA				
6,0 - 62,7	0,932 (0,879 - 0,985)	0,926 (-1,240 - 3,091)	0,9943	97,9 - 108,3
3,0 - 157,0	0,947 (0,892 - 1,002)	0,999 (-4,347 - 6,345)	0,9979	94,5 - 107,7
3,3 - 163,6	0,910 (0,824 - 0,957)	3,239 (-1,628 - 8,106)	0,9946	85,0 - 109,5
IgG				
3,0 - 41,9	0,987 (0,970 - 1,004)	0,405 (-0,037 - 0,847)	0,9997	93,5 - 101,2
2,7 - 67,6	0,976 (0,839 - 1,112)	4,303 (-0,854 - 9,459)	0,9801	77,6 - 100,1
2,9 - 260,5	0,800 (0,648 - 0,951)	11,6 (-9,4 - 32,6)	0,9693	85,6 - 122,0

Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε με την ανάμιξη ορών με γνωστά επίπεδα tTG αντισωμάτων με δείγματα ορού πιθανώς παρεμβαλλόμενα και με την μελέτη απόκλισης από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Καμία σημαντική παρέμβαση δεν εκδηλώθηκε για τις ακόλουθες ουσίες στα επίπεδα που δηλώνονται: Αιμοσφαιρίνη (2 g/L), Χολερυθρίνη (342 μmol/L), και Ρευματοειδής Παράγοντας (100 EU/ml).



ImmuliTM

Celiaco tTG

ELISA para anticuerpos de transglutaminasa tisular humana

IVD Para utilización de diagnóstico *in vitro*

ETIQUETA DEL PRODUCTO

REF 5144A Celiaco tTG IgA ELISA 96 Determinaciones

REF 5144G Celiaco tTG IgG ELISA 96 Determinaciones

UTILIZACIÓN PREVISTA

Inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA) para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos de transglutaminasa tisular anti-humana IgA o IgG en suero humano para el diagnóstico de enteropatía por gluten / enfermedades celiacas (EC) junto con otras conclusiones clínicas y de laboratorio.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las enfermedades celiacas (EC) son afecciones gastrointestinales autoinmunes que pueden tener lugar en individuos genéticamente susceptibles inducidas por la ingestión de cereales que contengan gluten, como el trigo, la cebada y el centeno. Los síntomas clásicos de las EC incluyen diarrea, pérdida de peso y desnutrición. Sólo un pequeño porcentaje de los pacientes de EC presenta los síntomas clásicos. En consecuencia, el espectro clínico de las EC se ha ampliado mucho más que en el pasado para incluir a pacientes que no presentan los síntomas clásicos. Es bastante común que los síntomas iniciales no sean gastrointestinales o que los síntomas gastrointestinales, en caso de presentarse, sean leves o intermitentes. La necesidad de examinar una variedad más amplia de presentaciones clínicas ha provocado que se diagnostique de EC a una mayor cantidad de individuos de edad avanzada que antes. Los adultos pueden sufrir deficiencia de hierro, anemia macrocítica y hipocalcemia.

En base a los estudios, la difusión de las EC es muy variable. Si solo se utilizan criterios clínicos para determinar su difusión, la incidencia de las EC es mucho menor en comparación con la incidencia establecida por los métodos serológicos.^{1,2} Si se utilizan métodos serológicos, estudios recientes indican que la incidencia de las EC en la población general es de entre una cada 100 personas y una cada 500 personas.

El hecho de no diagnosticar las EC de forma temprana puede provocar en un individuo complicaciones a largo plazo como atrofia esplénica y linfoma intestinal.^{3,4} Una dieta sin gluten normaliza la mucosa y ayuda a reducir el potencial de gravedad.

El examen histológico de la biopsia del intestino delgado sigue siendo el procedimiento de preferencia para el diagnóstico de las EC, pero tiene sus propias limitaciones. Por ejemplo, algunos pacientes con EC latentes o incluso activas pueden presentar histopatologías normales.⁵

Los criterios revisados de la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) incluyen solamente una biopsia única con remisión clara de los síntomas clínicos con una dieta sin gluten.⁶ Una serología positiva en el momento del diagnóstico con desaparición con la dieta sin gluten contribuye al diagnóstico. Los diversos análisis serológicos utilizados en el examen de pacientes que se cree que podrían sufrir EC incluyen los de anticuerpos anti-gliadina (AGA), anti-endomisial (EMA) y transglutaminasa tisular (tTG). Los anticuerpos anti-gliadina y tTG son detectados por el método ELISA, mientras que los EMA son detectados mediante inmunofluorescencia indirecta. Los EMA son indicadores muy específicos de las EC. Sin embargo, el análisis de EMA es un método inmunohistoquímico que requiere experiencia a la hora de leer las reacciones de inmunofluorescencia.⁷

Desde la identificación del tTG como el antígeno endomisial, se han establecido los métodos ELISA para detectar anticuerpos en el suero de pacientes con EC. La ventaja del análisis de anticuerpos anti-tTG es que es automatizable y menos subjetivo que el EMA. Por este motivo, muchos laboratorios han optado por la utilización del método de anticuerpos tTG como método de análisis. El tTG Celiaco ImmuliTM es un

ES

inmunoensayo único que utiliza sustancias químicas especiales para la detección de anticuerpos de tTG con un alto grado de especificidad y de sensibilidad y que minimiza la detección de anticuerpos no específicos en otros controles de enfermedades que se presenta en otros inmunoensayos de tTG.⁸⁻¹¹

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El análisis es realizado como un inmunoensayo de fase sólida. Los micropocillos son recubiertos con un antígeno humano recombinante de Transglutaminasa Tisular y a continuación se realiza una fase de bloqueo para reducir los vínculos no específicos durante el ensayo. Se incuban en los pozos recubiertos con el antígeno controles, calibradores y el suero del paciente para que los anticuerpos específicos puedan presentarse en el suero para unirse al antígeno tTG. Los anticuerpos separados y otras proteínas del suero son eliminados lavando los micropocillos. Se detectan los anticuerpos unidos añadiendo a los micropocillos una enzima etiquetada conjugado anti-humano IgA o IgG. El conjugado no unido es eliminado lavándolo. A continuación se añade a los pocillos sustrato de enzima específica (TMB) y se detecta la presencia de anticuerpos gracias a un cambio de color producido por la conversión del sustrato de TMB en un producto de reacción de color. Se detiene la reacción y la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, es leída por un espectrofotómetro a 250 nm. Los resultados son expresados en unidades de ELISA por milímetro (EU/ml) y consignados como positivos o negativos.

REACTIVOS

Almacenamiento y preparación

Guarde todos los reactivos a entre 2 y 8°C. **No los congele.** Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si se los maneja y almacena de acuerdo con estas instrucciones.

No lo utilice si el reactivo no está limpio o si contiene un precipitado. Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (20-25°C) antes de su utilización.

Reconstituya el tampón de lavado hasta un litro con agua destilada o desionizada. Si lo guarda entre 2 y 8°C, el tampón de lavado reconstituido es estable hasta la fecha de caducidad del equipo.

Las tiras de micropocillos recubiertos son de un solo uso. Las tiras de micropocillos no utilizadas deberían ser recolocadas con cuidado en la bolsa con desecantes para evitar la condensación y ser almacenadas a 2-8°C.

Precauciones

Todos los componentes provenientes de seres humanos utilizados han sido analizados en busca de HBsAg, HCV, HIV-1 y 2 y HTLV-I han dado negativo de acuerdo con los exámenes necesarios de la FDA. Sin embargo, los derivados de sangre humana y las muestras de pacientes deberían considerarse potencialmente infecciosas.¹² Siga unas buenas prácticas de laboratorio a la hora de guardar, preparar y desechar estos materiales.

Deben seguirse las instrucciones exactamente tal como aparecen aquí para garantizar unos resultados válidos. No cambie los componentes del equipo por otros de fuentes externas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio para minimizar la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos a la hoja de manejarlos. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas.

Materiales proporcionados

Celiaco tTG IgA ELISA ImmuLisa™

REF 5144A

Celiaco tTG IgG ELISA ImmuLisa™

REF 5144G

El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 96 determinaciones.

12 x 8

MICROPLATE | **CtTG**

Microplaca con micropocillos individuales escindibles. Recubierta con tTG recombinante humana. Lista para su utilización.

1 x 1.75 ml

CONTROL | **+CtTG-A**

Control Positivo listo para su utilización (*tapón rojo*) para **REF** 5144A. Contiene suero humano positivo en anticuerpos tTG IgA. El registro de concentración esperado en EU/ml está impreso en la etiqueta.

1 x 1.75 ml

CONTROL | **+CtTG-G**

Control Positivo listo para su utilización (*tapón rojo*) para **REF** 5144G. Contiene suero humano positivo en anticuerpos tTG IgG. El registro de concentración esperado en EU/ml está impreso en la etiqueta.

1 x 1.75 ml

CONTROL | **-**

Control Negativo listo para su utilización (*tapón blanco*). Contiene suero humano.

5 x 1.75 ml	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 2px;">CALIBRATOR A C tTG-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 2px;">CALIBRATOR B C tTG-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 2px;">CALIBRATOR C C tTG-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 2px;">CALIBRATOR D C tTG-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 2px;">CALIBRATOR E C tTG-A</div>	<p>Juego de 5 calibradores listos para su utilización para [REF] 5144A. Calibrador A (<i>tapón verde</i>) 160 EU/ml, Calibrador B (<i>tapón violeta</i>) 80 EU/ml, Calibrador C (<i>tapón azul</i>) 40 EU/ml, Calibrador D (<i>tapón amarillo</i>) 20 EU/ml, y Calibrador E (<i>tapón naranja</i>) 1 EU/ml. Provenientes de suero humano con anticuerpos tTG IgA. Las concentraciones en EU/ml están impresas en las etiquetas.</p>
5 x 1.75 ml	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 2px;">CALIBRATOR A C tTG-G</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 2px;">CALIBRATOR B C tTG-G</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 2px;">CALIBRATOR C C tTG-G</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 2px;">CALIBRATOR D C tTG-G</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 2px;">CALIBRATOR E C tTG-G</div>	<p>Juego de 5 calibradores listos para su utilización para [REF] 5144G. Calibrador A (<i>tapón verde</i>) 320 EU/ml, Calibrador B (<i>tapón violeta</i>) 80 EU/ml, Calibrador C (<i>tapón azul</i>) 40 EU/ml, Calibrador D (<i>tapón amarillo</i>) 20 EU/ml, y Calibrador E (<i>tapón naranja</i>) 1 EU/ml. Provenientes de suero humano con anticuerpos tTG IgG. Las concentraciones en EU/ml están impresas en las etiquetas.</p>
1 x 15 ml	[IgA-CONJ HRP]	<p>Conjugado HRP antihumano IgA para [REF] 5144A. Listo para su utilización.</p>
1 x 15 ml	[IgG-CONJ HRP]	<p>Conjugado HRP antihumano IgG para [REF] 5144G. Listo para su utilización.</p>
1 x 60 ml	[DIL]	<p>Diluyente de suero. Listo para su utilización. De color morado.</p>
1 x 15 ml	[SUBSTRATE TMB]	<p>Sustrato de enzima TMB. Listo para su utilización. Proteger de la luz.</p>
1 x 15 ml	[STOP H2SO4]	<p>Solución de parada*. Lista para su utilización.</p>
2 x viales	[BUF WASH]	<p>Tampón de lavado en polvo. Reconstituir a un litro cada uno.</p>
1 x		<p>Hojas de protocolo</p>

Componentes opcionales

1 x 60ml	[BUF WASH]	<p>Tampón de lavado líquido concentrado. Reconstituir a un litro.</p>
----------	------------	--

Símbolos utilizados en las etiquetas



Número de lote



Número de catálogo



Utilización diagnóstica in vitro



Utilizar antes de



Temperatura de almacenamiento



Consulte las instrucciones de uso



Número de análisis



Fabricante



Fecha de fabricación



*Peligro. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Provoca lesiones oculares graves. Lavarse concienzudamente tras la manipulación. Llevar guantes/prendas/gafas/mascara de proteccion. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fcil. Seguir aclarando. Si persiste la irritacin ocular: Consultar a un médico.

Materiales necesarios pero no suministrados

- Agua desionizada o destilada

ES

- Botella de plástico blando para el tampón de lavado diluido
- Pipetas capaces de suministrar de 5 µl a 1000 µl
- Extremos de pipeta desechables
- Tubos de ensayo limpios de 12 x 75 mm y rejilla para tubos de ensayo
- Temporizador
- Toallitas de papel absorbentes
- Lector de microplaca capaz de leer valores de absorbencia a 450 nm. Si está disponible el lector de microplaca de longitud de onda dual, el filtro de referencia debería fijarse a 600-650 nm
- Lavador de microplaca automático capaz de suministrar 200 µl

RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECIMENES

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. Guarde los especímenes entre 2° y 8°C durante un máximo de una semana. Para periodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente. Es recomendable que los especímenes congelados sean analizados al cabo de un año.

PROCEDIMIENTO

Notas del procedimiento

- Lea detenidamente la etiqueta del producto antes de empezar el ensayo.
- Todas las diluciones de las muestras del paciente deberían prepararse antes de empezar con el ensayo.
- Deje que los especímenes del paciente y los reactivos de los análisis se adapten a la temperatura ambiente antes de empezar con el procedimiento de análisis. Le sugerimos que deje los reactivos sobre la mesa de trabajo y fuera de la caja unos 30 minutos antes de su utilización. Vuelva a meter todos los especímenes y reactivos no utilizados en la nevera después de su utilización.
- Saque las tiras de micropocillos necesarias de la bolsa y vuelva a cerrarla cuidadosamente para evitar la condensación de los pocillos no utilizados. Vuelva a meter la bolsa a la nevera inmediatamente.
- **Una buena técnica de lavado es fundamental.** Si el lavado va a ser realizado a mano, aplique una corriente fuerte de tampón de lavado con una botella de lavado de boca ancha por toda la microplaca. **Se recomienda utilizar un lavador de microplacas automático.**
- Utilice una pipeta multicanal capaz de proveer a 8 a 12 pozos simultáneamente. Esto acelera el proceso y proporciona tiempos de incubación más uniformes.
- En todos los pasos es necesario controlar cuidadosamente el tiempo. El inicio de todos los periodos de incubación empieza al terminar de añadir el reactivo.
- Todas las muestras y reactivos deberían ser añadidos a la misma velocidad y en el mismo orden.

Método de análisis

Paso 1 Deje que los reactivos y especímenes se adapten a la temperatura ambiente.

Paso 2 Etiquete la hoja de protocolo para indicar que se han colocado muestras en los micropocillos. Una buena práctica de laboratorio es analizar las muestras por duplicado.

Paso 3 Para una **determinación cualitativa** utilice únicamente el Calibrador D (*vial con tapón amarillo*).

o

Para una **determinación semi-cuantitativa** utilice los Calibradores A a E tal como aparece en el plan de muestras siguiente.

	Cualitativo		
A	Base	S5	Etc.
B	-	S6	
C	+	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

	Semi-cuantitativo		
A	Base	S1	Etc.
B	-	S2	
C	+	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

ES

- Paso 4** Prepare una dilución **1:101** de las mezclas del paciente mezclando **5 µl** del suero del paciente con **500µl** de Diluyente de Suero.
- Paso 5** Saque los micropocillos necesarios de la bolsa y vuelva a meter en la nevera las tiras no utilizadas dentro de la bolsa cerrada. Coloque los micropocillos en la funda adicional proporcionada.
- Paso 6** Vierta **100 µl** de Calibradores listos para usar, controles positivos y negativos y muestras del paciente diluidas (**1:101**) en los micropocillos adecuados en base a la hoja de protocolo.
Nota: Incluya un pocillo con **100 µl** del Diluyente de Suero como reactivo base. Ajuste el medidor ELISA en función del reactivo base.
- Paso 7** Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** Lávelo **4x** con tampón de lavado. Para un lavado manual, llene cada micropocillo con tampón de lavado reconstituido. Deseche el fluido volcando y vertiendo el contenido de cada pocillo o aspirando el líquido de cada pocillo. Para secar el final del último lavado, vuelque las tiras y golpee los pocillos con fuerza con toallitas de papel absorbentes. Para lavadores automáticos, programe el lavador siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Paso 9** Vierta **100 µl** de Conjugado en los micropocillos.
- Paso 10** Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave todos los micropocillos siguiendo las instrucciones del Paso 8.
- Paso 12** Vierta **100 µl** de Sustrato de Enzimas en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Conjugado.
- Paso 13** Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Vierta **100 µl** de Solución de Parada en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Sustrato de Enzimas. Lea los valores de absorbencia a los **30 minutos** de añadir la Solución de Parada.
- Paso 15** Lea la absorbencia de cada micropocillo a **450 nm** si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda simple o a 450/630nm si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda dual con el reactivo base fijado a absorbencia cero.

Control de calidad

Los Calibradores, los Controles Positivo y Negativo y el reactivo base deben comprobarse en cada ensayo para verificar la integridad y la precisión del análisis. La medición de absorbencia del reactivo base debería ser $<0,3$. El Calibrador A debería tener una lectura de absorbencia de no menos de 1,0, de lo contrario la prueba debe repetirse. El control negativo debe ser <10 EU/ml. Si se realiza la prueba por duplicado, debería tomarse la media de ambas lecturas para determinar la lectura en EU/ml. Al realizar determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser mayor que la del control negativo y menor que la absorbencia del control positivo. Para las determinaciones semicuantitativas el control positivo debe arrojar valores dentro del registro estipulado en el vial.

RESULTADOS

Cálculos

Las concentraciones de las muestras del paciente pueden ser determinadas utilizando dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. muestra de análisis

----- X EU/ml de Calibrador D = EU/ml Muestra Análisis

Abs. de Calibrador D

Es recomendable indicar si los resultados cualitativos son “positivos” o “negativos”. Los resultados de los análisis iguales o superiores al Calibrador D son considerados positivos.

2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTITATIVA

Determine la absorbencia de los Calibradores A a E en base a sus concentraciones respectivas sobre papel para gráficos lineales logarítmicos. Determine las concentraciones en EU/ml en el eje X y la absorbencia en el eje Y y dibuje una curva de punto a punto. Determine las concentraciones de las muestras del paciente desde la curva de acuerdo con los valores de absorbencia correspondientes. Como alternativa, puede utilizar una curva de cuatro parámetros para trazar la curva estándar.

Es recomendable indicar si los resultados semi-cuantitativos son “positivos”, “negativos” o “indeterminados” con valores en unidades EU/ml. Los resultados indeterminados/en el límite deberían ser reanalizados y evaluados junto con otros métodos de laboratorio

Interpretación

Los valores de interpretación fueron determinados analizando 114 especímenes de control de donantes de sangre normales y sin enfermedades celíacas. La media de los sujetos normales más 2 SD fue establecida como límite del ensayo y se le asignó un valor arbitrario de 20 EU/ml. IMMCO recomienda la utilización del registro de referencia siguiente. Cada laboratorio debería validar los valores del ensayo para sus propias condiciones.

Valor anti-tTG Ab	Interpretación
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminado (Límite)
>25 EU/ml	Positivo

Calibrador

Los calibradores listos para utilizar vienen incluidos para proporcionar una determinación semi-cuantitativa y deben ser utilizados en cada análisis. Las muestras de pacientes que contienen niveles altos de anticuerpos pueden arrojar unos valores de absorbencia superiores que los del Calibrador A. Para determinar unos valores semi-cuantitativos precisos, esos especímenes deberían diluirse más para que entren en el registro de la curva del calibrador al volver a analizarlos. Para determinar los valores en EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. Guarde los especímenes entre 2°C y 8°C durante un máximo de una semana. Para periodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente.

Los resultados de los análisis sirven como ayuda para el diagnóstico y deberían ser considerados conjuntamente con otras pruebas clínicas y de laboratorio.

VALORES ESPERADOS

Normalmente se espera que los resultados de los análisis en la población normal sean negativos. Sin embargo, como la incidencia de las EC en la población normal es aproximadamente del 1%, algunos individuos aparentemente saludables y asintomáticos podrían dar positivo en anticuerpos tTG.

La incidencia y los niveles de anticuerpos anti-tTG dependen de la dieta. Los niveles de ese tipo de anticuerpos disminuyen y acaban convirtiéndose en negativos en los pacientes con EC que siguen una dieta sin gluten. De forma similar, los niveles de ese tipo de anticuerpos aumentarán y podrían convertirse en positivos en los pacientes con EC que seguían una dieta sin gluten e ingieren una dieta con gluten.¹³⁻¹⁵ Los pacientes con EC pero deficientes en IgA darán positivo en anticuerpos IgG para tTG. En esos casos se han realizado estudios para confirmar que el paciente es deficiente en IgA.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La utilidad de las pruebas ELISA ImmuLISA™ Celiaco tTG fue evaluada analizando especímenes de suero positivos característicos EMA de sujetos sospechosos de sufrir EC junto con controles de enfermedades y sueros humanos "normales". Estos especímenes también fueron analizados con las pruebas ELISA disponibles en los comercios y equipos de análisis de inmunofluorescencia. Los resultados se resumen a continuación.

A. ELISA ImmuLISA™ Celiaca tTG vs. otros inmunoensayos de tTG:

		Otros tTG IgA ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	74	19	93
CELIACO tTG	Negativo	2	90	92
IgA ELISA	Total	76	109	185

ES

Concordancia de porcentaje positivo: 97,4% (95% CI 90,0% - 99,5%)
Concordancia de porcentaje negativo: 82,6% (95% CI 73,9% - 88,9%)
Concordancia de porcentaje total: 88,6% (95% CI 83,0% - 92,7%)

Sujetos celíacos positivos en EMA: 93
Controles de enfermedades: 31
Sujetos normales sanos: 61

Otros tTG IgG ELISA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	74	21	95
CELIACO tTG	Negativo	31	184	215
IgG ELISA	Total	105	205	310

Concordancia de porcentaje positivo: 70,5% (95% CI 60,7% - 78,8%)
Concordancia de porcentaje negativo: 89,8% (95% CI 84,6% - 93,4%)
Concordancia de porcentaje total: 83,2% (95% CI 78,5% - 87,1%)

Sujetos celíacos positivos en EMA: 166
Controles de enfermedades: 53
Sujetos normales sanos: 91

B. ELISA ImmuLisa™ Celíaco tTG vs. EMA: Los resultados obtenidos con las ELISA Celíaca tTG fueron comparados con los resultados de anticuerpos endomisiales (EMA) obtenidos utilizando un IFA disponible comercialmente y una población clínica bien caracterizada.

Población con EC confirmada por EMA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	87	6	93
CELIACO tTG	Negativo	1	91	92
IgA ELISA	Total	88	97	185

Concordancia de porcentaje positivo: 98,9% (95% CI 92,9% - 99,9%)
Concordancia de porcentaje negativo: 93,8% (95% CI 86,5% - 97,5%)
Concordancia de porcentaje total: 96,2% (95% CI 92,1% - 98,3%)

Sujetos celíacos positivos en EMA: 93
Sujetos celíacos positivos en EMA IgA: 88
Sujetos celíacos deficientes en IgA: 5
Controles de enfermedades: 31
Sujetos normales sanos: 61

Población con EC confirmada por EMA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	72	7	79
CELIACO tTG	Negativo	6	191	197
IgG ELISA	Total	78	198	276

Concordancia de porcentaje positivo: 92,3% (95% CI 83,4% - 96,8%)
Concordancia de porcentaje negativo: 96,5% (95% CI 92,6% - 98,4%)
Concordancia de porcentaje total: 95,3% (95% CI 91,9% - 97,4%)

Sujetos celíacos positivos en EMA: 132 (74 positivos en EMA IgG)
Controles de enfermedades: 53
Sujetos normales sanos: 91

C. Sensibilidad y especificidad clínica: Se realizaron ensayos ELISA Celíaca tTG en poblaciones clínicas con enfermedades celíacas bien caracterizadas y se obtuvieron los resultados siguientes.

Enfermedad Celíaca

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	88	5	93
CELIACO tTG	Negativo	5	87	92
IgA ELISA	Total	93	92	185

Sensibilidad estimada: 94,6% (95% CI 87,3% - 98,0%)

ES

Especificidad estimada: 94,6% (95% CI 87,2% - 98,0%)

Concordancia: 94,6% (95% CI 90,0% - 97,2%)

Sujetos celíacos positivos en EMA IgA: 88

Sujetos celíacos deficientes en IgA: 5

Controles de enfermedades: 31

Sujetos normales sanos: 61

Enfermedad celíaca no deficiente en IgA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	87	0	87
CELIACO tTG	Negativo	1	0	1
IgA ELISA	Total	88	0	88
Sensibilidad estimada:		98,9% (95% CI 92,9% - 99,9%)		
Especificidad estimada:		--		
Concordancia:		98,9% (95% CI 92,9% - 99,9%)		

Sujetos celíacos positivos en EMA IgA: 88

Controles de enfermedades: 0

Sujetos normales sanos: 0

Enfermedad Celíaca

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	72	7	79
CELIACO tTG	Negativo	60	137	197
IgG ELISA	Total	132	144	276
Sensibilidad estimada:		54,5% (95% CI 45,7% - 63,2%)		
Especificidad estimada:		95,1% (95% CI 89,9% - 97,9%)		
Concordancia:		75,7% (95% CI 70,1% - 80,6%)		

Sujetos celíacos positivos en EMA: 132 (74 positivos en EMA IgG)

Controles de enfermedades: 53

Sujetos normales sanos: 91

Enfermedad celíaca deficiente en IgA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	21	0	21
CELIACO tTG	Negativo	1	0	1
IgG ELISA	Total	22	0	22
Sensibilidad estimada:		95,5% (95% CI 75,1% - 99,8%)		
Especificidad estimada:		--		
Concordancia:		95,5% (95% CI 75,1% - 99,8%)		

Sujetos con enfermedad celíaca deficientes en IgA: 22

Controles de enfermedades: 0

Sujetos normales sanos: 0

Positivo Negativo Total

D. Reactividad cruzada: Un total de 63 especímenes potencialmente reactivos cruzados de individuos con otras afecciones autoinmunes o que dieron positivo en otros autoanticuerpos fueron analizados en anticuerpos tTG utilizando el sistema ImmuLISA™ Celíaco tTG.

Enfermedad	n	IgA Positivo n (%)	IgG Positivo n (%)
Enfermedad de Graves	11	0 (0%)	0 (0%)
Tiroiditis de Hashimoto	10	0 (0%)	0 (0%)
Positivo en ANA*	9	0 (0%)	1 (11%)
Positivo en CCP**	10	0 (0%)	0 (0%)
Positivo en RF**	9	0 (0%)	0 (0%)
Colitis ulcerativa	5	0 (0%)	0 (0%)
Enfermedad de Crohn	9	0 (0%)	2 (22%)
Total	63	0 (0%)	3 (5%)

* Anticuerpos Antinucleares

** Anticuerpos Anti-Péptidos Cíclicos Citrulinados

Precisión

La precisión fue analizada con múltiples especímenes seleccionados en todo el registro del ensayo. Se realizaron tres ensayos en días distintos para determinar los resultados entre días. Se realizó otra serie adicional de diez duplicados para determinar la repetibilidad. Los resultados se resumen a continuación.

Equipo	Nº S	Media (EU/ml)	Imprecisión total		Entre días		Dentro de serie (Repetibilidad)	
			SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
Ensayo celiaco tTG IgA	1	10,6	1,086	10,2%	1,135	10,7%	1,095	10,2%
	2	20,4	1,224	6,0%	1,476	7,2%	0,956	4,7%
	3	25,0	1,496	6,0%	1,740	6,9%	1,271	5,1%
	4	34,9	2,075	5,9%	2,099	6,1%	2,110	6,0%
	5	48,7	2,634	5,4%	3,661	7,5%	1,090	2,2%
	6	110,6	4,008	3,6%	4,221	3,8%	3,960	3,6%
	7	134,7	7,253	5,4%	8,728	6,5%	5,904	4,4%
	8	183,7	6,161	3,4%	6,606	3,6%	5,615	3,0%
Ensayo celiaco tTG IgG	1	15,3	1,100	7,2%	1,283	8,3%	0,929	6,1%
	2	24,3	1,727	7,1%	2,101	8,6%	1,355	5,6%
	3	29,8	1,931	6,5%	2,492	8,4%	1,289	4,3%
	4	60,5	3,046	5,0%	3,647	6,0%	2,507	4,1%
	5	99,1	4,720	4,8%	5,687	5,7%	3,756	3,8%
	6	233,7	10,022	4,3%	11,918	5,0%	7,108	3,1%
	7	263,5	13,061	5,0%	14,124	5,4%	11,794	4,4%

Límite de detección

El límite de detección (LD) fue determinado en base a 60 duplicados de la base y 10 duplicados de 6 muestras de nivel bajo (NHS). El LD para IgA fue de 4,0 EU/ml. El LD para IgG fue de 2,9 EU/ml.

Linealidad y recuperación

La linealidad y la recuperación fueron analizadas diluyendo especímenes positivos en el registro de ensayo en diluciones equidistantes y comparando los resultados reales frente a los esperados. El registro lineal de los ensayos se fijó en 4,0 (LD) – 160 EU/ml para IgA y 2,9 (LoD) – 260 EU/ml para IgG. Los resultados se resumen a continuación:

Registro de análisis (EU/ml)	Inclinación (95% CI)	Corte Y (95% CI)	R ²	% recuperación (obtenido/esperado)
IgA				
6,0 a 62,7	0,932 (0,879 a 0,985)	0,926 (-1,240 a 3,091)	0,9943	97,9 a 108,3
3,0 a 157,0	0,947 (0,892 a 1,002)	0,999 (-4,347 a 6,345)	0,9979	94,5 a 107,7
3,3 a 163,6	0,910 (0,824 a 0,957)	3,239 (-1,628 a 8,106)	0,9946	85,0 a 109,5
IgG				
3,0 a 41,9	0,987 (0,970 a 1,004)	0,405 (-0,037 a 0,847)	0,9997	93,5 a 101,2
2,7 a 67,6	0,976 (0,839 a 1,112)	4,303 (-0,854 a 9,459)	0,9801	77,6 a 100,1
2,9 a 260,5	0,800 (0,648 a 0,951)	11,6 (-9,4 a 32,6)	0,9693	85,6 a 122,0

Interferencia

La interferencia fue estudiada mezclando sueros con niveles de anticuerpos tTG conocidos con muestras de suero con interferencia potencial y estudiando la desviación respecto a los resultados esperados. No se demostró una interferencia importante para las siguientes sustancias en los niveles indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 µmol/L), y Factor Reumatoide (100 EU/ml).

ImmuLisa™

Celiac tTG

rHuman Gewebe-Transglutaminase Antikörper ELISA

IVD Nur zur In-vitro-Diagnostik

Produkteinlage

REF	5144A	Celiac tTG IgA ELISA	96 Bestimmungen
REF	5144G	Celiac tTG IgG ELISA	96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) zur qualitativen und semi-quantitativen Bestimmung von anti-humanem Gewebe-Transglutaminase IgA- oder IgG-Antikörpern im Humanserum, zur Unterstützung bei der Diagnose von glutensensitiver Enteropathie / Zöliakie (CD), in Verbindung mit anderen laboratorischen und klinischen Befunden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Zöliakie (CD) ist eine autoimmune gastrointestinale Störung, die bei Personen mit erblicher Vorbelastung auftreten kann, ausgelöst durch die Aufnahme von glutenhaltigem Getreide wie Weizen, Gerste und Roggen. Zu den klassischen Symptomen einer Zöliakie zählen Durchfall, Gewichtsverlust und Unterernährung. Nur ein geringer Prozentsatz der Patienten mit Zöliakie weist die klassischen Symptome auf. Als Konsequenz ist das klinische Spektrum von Zöliakie umfassender als in der Vergangenheit, um auch die Patienten einzuschließen, die nicht die klassischen Symptome aufweisen. Als erste Symptome sind nicht gastrointestinale nicht ungewöhnlich, auch können gastrointestinale Symptome in leichter oder diskontinuierlicher Form auftreten. Die Notwendigkeit, ein breiteres Spektrum klinischer Befunde zu untersuchen, führte zu einem Anstieg der Anzahl Personen, bei denen Zöliakie in fortgeschrittenem Alter diagnostiziert wurde. Erwachsene können Eisenmangel, Macrocytic Anämie und Hypokalzämie auftreten.

Durch Studien fand man heraus, dass die Prävalenz von Zöliakie höchst variabel ist. Wenn bei der Bestimmung der Verbreitung allein klinische Kriterien genutzt werden, so ist die Häufigkeit von CD viel geringer im Vergleich zu der Häufigkeit, die durch serologische Methoden bestimmt wird.^{1,2} Mit Hilfe serologischer Methoden zeigten neuere Untersuchungen, dass die Verbreitung von CD bei der Bevölkerung zwischen 1 pro 100 und 1 pro 500 liegt.

Eine zu später Diagnose von CD kann bei einem Patienten zu langzeitigen Komplikationen führen, wie Milzatrophy und Intestinal-Lymphom.^{3,4} Eine glutenfreie Diät (GFD) normalisiert die Schleimhaut und verringert das maligne Potential.

Die histologische Untersuchung der Dünndarm-Biopsie wird der Standard für die Diagnose von CD bleiben, bringt allerdings Einschränkungen mit sich. Hierzu zählen einige Patienten mit latenten oder aktueller CD, die normale histopathologische Werte aufweisen.

Zu den überarbeiteten Kriterien der European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGHAN) zählt nur eine einzige Biopsie mit einer klar umrissenen Remission klinischer Symptome zu GFD.⁶ Eine positive Serologie zum Zeitpunkt der Diagnose mit Verschwinden von GFD trägt zur Diagnose bei. Zu den verschiedenen serologischen Tests, die bei der Untersuchung von Patienten mit Verdacht auf CD durchgeführt werden, zählen Untersuchungen auf Antikörper gegen Gliadin (AGA), Endomysial (EMA) und Gewebe-Transglutaminase (tTG). Antikörper gegen Gliadin und tTG erkennt ELISA, EMA die indirekte Immunfluoreszenz. EMA sind sehr spezifische Anzeichen für CD. Der EMA-Test ist eine immunhistochemische Methode, die Erfahrung mit immunfluoreszierenden Reaktionen erfordert.⁷

Seit der Erkennung von tTG als Antigen gegen Endomysial, wird die ELISA Methode genutzt, um Antikörper im Serum von Patienten mit CD zu finden. Der Vorteil der Anti-tTG Antikörper-Untersuchung ist, dass sie automatisierbar und weniger subjektiv als EMA ist. Aus diesem Grund haben sich viele Labore dazu

DE

entschlossen, die tTG-Antikörper Methode als Screeningmethode zu nutzen. ImmuLisa™ Celiac tTG ist ein einzigartiges immunchemisches Verfahren das eine besondere Chemie verwendet, um Antikörper gegen tTG zu finden, mit einem hohen Grad an Spezifität und Empfindlichkeit und das die Auffindung nicht-spezifischer Antikörper in anderen Krankheitsuntersuchungen minimiert, wie es bei einigen anderen tTG immunchemischen Verfahren berichtet wurde.⁸⁻¹¹

VERFAHRENSPRINZIPIEN

Der Test wird als immunologischer Festphasentest durchgeführt. Mikrovertiefungen werden mit einem rekombinanten menschlichen Gewebe-Transglutaminase-Antigen umgeben, gefolgt von einem Blockierungsschritt, um die nicht-spezifische Bindung während der Untersuchung zu reduzieren. Kontrollen, Kalibratoren und Patientenserum werden in den mit dem Antigen umgebenen Vertiefungen inkubiert, damit sich die im Serum enthaltenen Antikörper an das tTG-Antigen binden können. Ungebundene Antikörper und andere Proteine des Serums werden durch Auswaschung der Mikrovertiefungen entfernt. Gebundene Antikörper werden durch die Hinzugabe eines Enzym-gekennzeichneten IgA- oder IgG-Konjugats zu den Mikrovertiefungen erkannt. Das ungebundene Konjugat wird durch Auswaschung entfernt. Ein bestimmtes Enzymsubstrat (TMB) wird dann zu den Vertiefungen hinzugefügt und das Vorhandensein von Antikörpern wird durch eine Änderung der Farbe angezeigt, durch die Konversion des TMB-Substrats zu einem farbigen Reaktionsprodukt. Die Reaktion wird angehalten und die Intensität der Farbänderung, die proportional zu der Konzentration der Antikörper ist, wird von einem Spektrofotometer bei 450 nm abgelesen. Die Ergebnisse werden in ELISA Einheiten pro Millimeter (EU/ml) angegeben und als positiv oder negativ angezeigt.

REAGENZIEN

Lagerung und Vorbereitung

Alle Reagenzien bei 2-8°C lagern. **Nicht einfrieren.** Die Reagenzien sind bis zum Ablaufdatum stabil, wenn sie wie angewiesen gelagert und behandelt werden.

Verwenden Sie es nicht, wenn das Reagenz nicht farblos oder wenn ein Präzipitat vorhanden ist. Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch (20-25°C) auf Raumtemperatur gebracht werden.

Den Waschpuffer zu 1 Liter mit destilliertem oder vollentsalztem Wasser herstellen. Bei Lagerung mit 2-8°C bleibt der hergestellte Waschpuffer bis zum Kit-Ablaufdatum stabil.

Beschichtete Mikrovertiefungsstreifen sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Ungebrauchte Mikrovertiefungsstreifen sollten im Beutel, der Trocknungsmittel enthält, sorgfältig wieder versiegelt werden, um Kondensation zu verhindern, und bei 2-8 °C gelagert werden.

Vorsichtsmaßnahmen

Alle verwendeten menschlichen Bestandteile wurden negativ auf HBsAg, HCV, HIV-1 und 2 und HTLV-I getestet, mit Hilfe eines FDA erforderlichen Tests. Derivate menschlichen Blutes und Patientenproben sollten als potentiell ansteckend behandelt werden. Befolgen Sie die sachgemäßen Vorgänge bezüglich Lagerung, Zubereitung und Entsorgung dieser Materialien.¹²

Die Anleitung in diesem Set sollte genauestens befolgt werden, um exakte Resultate zu erzielen. Tauschen Sie keine Teile des Sets mit denen aus anderen Quellen aus. Befolgen Sie die sachgemäßen Vorgänge, um die mikrobielle und Kreuzkontamination von Reagenzien bei der Nutzung zu minimieren. Benutzen Sie keine Teile des Sets nach dem Verfallsdatum auf dem Etikett.

Materialien

ImmuLisa™ Celiac tTG IgA ELISA
ImmuLisa™ Celiac tTG IgG ELISA

REF 5144A
REF 5144G

Das Set enthält ausreichend Reagenzien für 96 Tests.

- | | | |
|--------------------|---|---|
| 12 x 8 | MICROPLATE C tTG | Mikroplatte mit einzelnen abbrechbaren Mikrovertiefungen. Ummantelt mit rekombinatem menschlichen tTG. Gebrauchsfertig. |
| 1 x 1.75 ml | CONTROL + C tTG-A | Gebrauchsfertige positive Kontrolle (rote Kappe) für REF 5144A. Enthält menschliches Serum, positiv auf tTG, IgA-Antikörper. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt. |
| 1 x 1.75 ml | CONTROL + C tTG-G | Gebrauchsfertige positive Kontrolle (rote Kappe) für REF 5144G. Enthält menschliches Serum, positiv auf tTG, IgG-Antikörper. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt. |







DE


1 x 1.75 ml	CONTROL-	Gebrauchsfertige negative Kontrolle (weiße Kappe). Enthält menschliches Serum.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A CtTG-A CALIBRATOR B CtTG-A CALIBRATOR C CtTG-A CALIBRATOR D CtTG-A CALIBRATOR E CtTG-A	Gebrauchsfertiger Satz von 5 Kalibratoren für REF 5144A. Kalibrator A (grüne Kappe) 160 EU/ml, Kalibrator B (violette Kappe) 80 EU/ml, Kalibrator C (blaue Kappe) 40 EU/ml, Kalibrator D (gelbe Kappe) 20 EU/ml, und Kalibrator E (orangene Kappe) 1 EU/ml. Aus menschlichem Serum mit tTG IgA Antikörpern. Konzentrationen in EU/ml stehen auf dem Etikett.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A CtTG-G CALIBRATOR B CtTG-G CALIBRATOR C CtTG-G CALIBRATOR D CtTG-G CALIBRATOR E CtTG-G	Gebrauchsfertiger Satz von 5 Kalibratoren für REF 5144G. Kalibrator A (grüne Kappe) 320 EU/ml, Kalibrator B (violette Kappe) 80 EU/ml, Kalibrator C (blaue Kappe) 40 EU/ml, Kalibrator D (gelbe Kappe) 20 EU/ml, und Kalibrator E (orangene Kappe) 1 EU/ml. Aus menschlichem Serum mit tTG, IgG-Antikörpern. Konzentrationen in EU/ml stehen auf dem Etikett.
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	HRP anti-menschliches IgA Konjugat für REF 5144A. Gebrauchsfertig.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP anti-menschliches IgG Konjugat für REF 5144G. Gebrauchsfertig.
1 x 60 ml	DIL	Serum Verdünnungsmittel. Gebrauchsfertig Farbkodiert lila.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	TMB Enzymsubstrat. Gebrauchsfertig Vor Licht schützen .
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Stopplösung*. Gebrauchsfertig.
2 x Ampullen	BUF WASH	Puderwaschpuffer. Auf jeweils einen Liter einstellen .
1 x		Protokollblätter

Optionale Komponenten

1 x 60ml	BUF WASH	Flüssigkeit konzentrierter Waschpuffer. Zu einem Liter herstellen.
----------	----------	--

Symbole auf den Etiketten

LOT	Chargennummer
REF	Katalognummer
IVD	In vitro diagnostischer Gebrauch
	Verwenden bis
	Lagertemperatur
	Finden Sie Anweisungen für die Verwendung
	Anzahl an Tests
	Hersteller
	Herstellungsdatum

 *Gefahr. Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Verursacht schwere Augenschäden. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Erforderliche Materialien, die nicht enthalten sind

- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für verdünnten Waschpuffer
- Pipetten für 5 µl bis 1000 µl
- Wegwerfbare Pipettenköpfe
- Saubere Reagenzgläser 12 x 75 mm und Halter für Reagenzgläser

DE

- Uhr
- Absorbierende Papiertücher
- Leser für Mikroplatten, für Absorptionswerte bis 450 nm. Wenn ein Doppelwellenlängen-Leser für Mikroplatten verfügbar ist, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm gestellt sein.
- Automatischer Wascher für Mikroplatten für die Verteilung von 200 µl

SAMMLUNG UND BEHANDLUNG VON PROBEN

Bei diesem Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Grob hämolisierte, lipämisch oder mikrobisch verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinträchtigen und sollten nicht verwendet werden. Die Proben bei 2-8°C für nicht länger als eine Woche lagern. Bei längerer Lagerung sollten die Serumproben eingefroren werden. Das wiederholte Einfrieren und Auftauen von Proben vermeiden. Es wird empfohlen, dass eingefrorene Proben innerhalb eines Jahres geprüft werden.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie genau die Packungsbeilage bevor Sie mit der Untersuchung beginnen.
- Alle Verdünnungen der Patientenprobe müssen vor Beginn der Untersuchung vorbereitet sein.
- Lassen Sie Patientenproben und Testreagenzien vor Beginn der Untersuchung auf Zimmertemperatur aufwärmen. Es wird empfohlen, dass die Reagenzien 30 Minuten vor dem Gebrauch außerhalb der Box gelassen werden. Stellen Sie direkt nach dem Gebrauch alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien wieder in den Kühlschrank.
- Entfernen Sie alle Mikrotiterstreifen aus dem Behälter und verschließen Sie den Behälter wieder vorsichtig, um Kondensation der nichtgebrauchten Vertiefungen zu verhindern. Bringen Sie den Behälter direkt nach dem Gebrauch wieder in den Kühlschrank.
- **Eine korrekte Waschtechnik ist entscheidend.** Wenn die Waschung von Hand durchgeführt wird, wird die korrekte Waschung erreicht durch einen starken Strom des Waschpuffers mit einer Waschflasche mit großer Öffnung über der ganzen Mikroplatte. **Ein automatischer Reiniger für Mikroplatten wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Pipette mit mehreren Kanälen, für 8 oder 12 Vertiefungen gleichzeitig. Dies beschleunigt den Prozess und bietet einheitlichere Inkubationszeiten.
- Eine genaue Überwachung der Zeit ist bei allen Schritten wichtig. Der Beginn der Inkubationszeit beginnt mit der Komplettierung der Hinzufügung der Reagenzien.
- Die Hinzufügung aller Proben und Reagenzien sollte in der gleichen Menge und der gleichen Häufigkeit geschehen.

Testmethode

Schritt 1 Lassen Sie alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur erwärmen.

Schritt 2 Beschriften Sie das Protokollblatt um die Hinzugabe der Probe zur Vertiefung anzugeben. Von den Proben sollten Duplikate vorhanden sein.

Schritt 3 Für eine **qualitative Bestimmung** nutzen Sie nur Kalibrator D (*Ampulle mit gelber Kappe*).

oder

Für eine semi-qualitative Bestimmung nutzen Sie die Kalibratoren A bis E wie unten gezeigt.

	Qualitativ		
A	Leerprobe	S5	usw.
B	-Kontrolle	S6	
C	+ Kontrolle	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

	Semiquantitativ		
A	Leerprobe	S1	usw.
B	-Kontrolle	S2	
C	+ Kontrolle	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

Schritt 4 Bereiten Sie **1:101** Verdünnung der Patientenproben vor indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit **500µl** der Serumsverdünnung mischen.

DE

Schritt 5 Entfernen Sie die erforderlichen Mikrotiterstreifen aus dem Behälter und geben Sie die nicht gebrauchten Streifen in dem verschlossenen Behälter in den Kühlschrank. Stellen Sie die Mikrovertiefungen in den zusätzlichen Halter.

Schritt 6 Pipette mit **100 µl** gebrauchsfertigen Kalibratoren, positiven und negativen Kontrollen und verdünnten Patientenproben (**1:101**) gemäß dem Protokollblatt in die passenden Mikrovertiefungen.

Beachte: Nutzen Sie eine Vertiefung mit **100 µl** der Serenverdünnung als Leerversuch.

Schritt 7 **30 Minuten** (± 5 min) bei Raumtemperatur inkubieren.

Schritt 8 **4x** mit Waschpuffer waschen. Füllen Sie bei manueller Waschung jede Vertiefung mit neuem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit indem Sie alle Inhalte der einzelnen Vertiefungen auswaschen oder saugen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung heraus. Um nach der letzten Waschung abzulöschen, geben Sie einen Streifen hinein und stellen Sie die Vertiefungen auf Papiertücher. Für die automatische Reinigung programmieren Sie den Reiniger gemäß den Angaben des Herstellers.

Schritt 9 Pipette mit **100 µl** des Konjugats in Mikrovertiefungen.

Schritt 10 **30 Minuten** (± 5 min) bei Raumtemperatur inkubieren.

Schritt 11 Waschen Sie alle Mikrovertiefungen gemäß Schritt 8.

Schritt 12 Pipette mit **100 µl** des Enzymsubstrats in jede Vertiefung in der gleichen Reihenfolge und der Zeit wie das Konjugat.

Schritt 13 **30 Minuten** (± 5 min) bei Raumtemperatur inkubieren.

Schritt 14 Pipette mit **100 µl** der Stopplösung in jede Vertiefung in der gleichen Reihenfolge und der Zeit wie bei der Zugabe des Enzymsubstrats geben. Lesen Sie die Absorbierungswerte innerhalb von 30 Minuten ab Hinzugabe der Stopplösung ab.

Schritt 15 Lesen Sie die Absorbierung der einzelnen Vertiefungen bei 450 nm ab, durch einen einzelnen oder bei 450/630nm durch einen doppel-Wellenlängen Leser für Mikroplatten ab, gegen den Leerversuch, der als null Absorbierung eingestuft wird..

Qualitätskontrolle

Kalibratoren, positive und negative Kontrollen und ein Leerversuch sind bei jeder Untersuchung nötig, um die Integrität und Genauigkeit des Tests zu gewährleisten. Der Absorbierungswert des Leerversuchs sollte <0.3 sein. Der Kalibrator A muss einen Absorbierungswert von nicht weniger als 1,0 haben, ansonsten muss der Test wiederholt werden. Die negative Kontrolle muss <10 EU/ml sein. Wenn der Test als Duplikat durchgeführt wird, muss der Mittelwert der Ablesungen genutzt werden, um die EU/ml zu bestimmen. Während der qualitativen Bestimmungen, muss die optische Dichte von Kalibrator D größer sein als die der negativen Kontrolle und geringer als der Absorbierung der positiven Kontrolle. Bei den semi-qualitativen Bestimmungen muss die positive Kontrolle Werte ergeben, die auf dem Behälter angegeben sind.

ERGEBNISSE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können durch eine der folgenden beiden Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Abs. der Testprobe

----- X EU/ml von Kalibrator D = EU/ml Testprobe

Abs. von Kalibrator D

Es wird empfohlen, dass qualitative Resultate als "positiv" oder "negativ" berichtet werden. Probenresultate größer oder gleich Kalibrator D werden als positiv angesehen.

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Notieren Sie die Absorbierung von Kalibrator A bis E gegen die entsprechenden Konzentrationen auf linearem Millimeterpapier. Notieren Sie die Konzentrationen in EU/ml auf der X-Achse gegen die Absorbierung auf der Y-Achse und zeichnen Sie eine Punkt-zu-Punkt Kurve. Bestimmen Sie die Konzentrationen der Patientenproben aus der Kurve entsprechend den Absorbierungswerten. Als Alternative kann eine Kurve mit 4 Parametern genutzt werden, um die Standardkurve zu zeichnen.

DE

Es wird empfohlen, dass semiquantitative Resultate als "positiv", "negativ", oder "unbestimmt" mit EU/ml Einheitswerten berichtet werden. Unbestimmte/Grenzlinsen Resultate sollten erneut getestet und zusammen mit anderen Labormethoden.

Interpretation

Interpretationswerte werden bestimmt durch die Untersuchung von 114 normalen Blutspendern und Kontrollproben, bei denen keine Zöliakie vorliegt. Der Mittelwert der normalen Subjekte plus 2 SD wurde als Grenzwert der Untersuchung festgelegt und erhielt einen beliebigen Wert von 20 EU/ml. IMMCO empfiehlt den Gebrauch des folgenden Referenzbereichs. Jedes Labor sollte Untersuchungswerte für Ihre eigenen Konditionen validieren.

anti-tTG Ab Wert	Interpretation
<20 EU/ml	Negativ
20-25 EU/ml	Unbestimmt (Borderline)
>25 EU/ml	Positiv

Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind enthalten für eine semi-quantitative Bestimmung und bei jedem Test verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörper-Niveaus können Absorbierungswerte ergeben, die höher sind als die von Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte zu ermitteln, müssen solche Proben weiter verdünnt werden, damit sie in den Bereich der Kalibrator Kurve fallen wenn sie erneut getestet werden. Um die EU/ml Werte zu bestimmen, multiplizieren Sie die erhaltenen Einheiten mit dem Verdünnungsfaktor.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Nur Serenproben sollten bei diesem Verfahren verwendet werden. Grob hämolisiert, lipämisch oder mikrobiell infizierte Proben können die Leistung der Untersuchung beeinträchtigen und dürfen nicht verwendet werden. Lagern Sie Proben bei 2°- 8°C nicht länger als eine Woche. Für eine längere Lagerung sollten die Proben gefroren werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben.

Die Testergebnisse dienen als Hilfe bei der Diagnose und sollten im Zusammenhang mit anderen Laboruntersuchungen und klinischen Befunden betrachtet werden.

ERWARTETE WERTE

Testergebnisse in einer normalen Population werden als negativ erwartet. Da das Vorkommen von CD in der normalen Population bei etwa 1% liegt, können manche scheinbar gesunden, symptomfreien Personen einen positiven Test auf tTG-Antikörper ergeben.

Das Vorkommen und das Niveau von anti-tTG Antikörpern hängt ab vom Status der Diät. Die Niveaus dieser Antikörper sinken und werden irgendwann negativ bei Patienten mit CD, die auf einer glutenfreien Diät sind. Ähnlich werden die Niveaus dieser Antikörper steigen und irgendwann positiv werden bei Patienten mit CD, die auf einer glutenfreien Diät waren und eine glutenhaltige Diät begannen.¹³⁻¹⁵ Patienten mit CD, die aber IgA defizient sind, werden positive auf IgG-Antikörper zu tTG sein. In solchen Fällen können Untersuchungen durchgeführt werden um zu bestätigen, dass der Patient IgA-defizient ist.

LEISTUNGSSCHARAKTERISTIKEN

Die Verwendung der Immulisa™ Celiac tTG ELISAs wurde dadurch bewertet, dass gut charakterisierte EMA positive Serenproben von eventuellen CD-Patienten getestet wurden, zusammen mit Krankheitskontrollen und regulärem menschlichen Serum. Diese wurden auch mit dem kommerziell verfügbaren ELISA und immunfluoreszierenden Testsets getestet. Die Ergebnisse finden Sie unten.

A. Immulisa™ Celiac tTG ELISAs vs. anderen tTG-Immuntest:

		Anderer tTG IgA ELISA		
		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	74	19	93
CELIAC tTG	Negativ	2	90	92
IgA ELISA	Gesamt	76	109	185

Positiv Prozentsatz Übereinstimmung: 97,4% (95% CI 90,0% - 99,5%)

DE

Negativ Prozentsatz Übereinstimmung: 82,6% (95% CI 73,9% - 88,9%)

Gesamt Prozentsatz Übereinstimmung: 88,6% (95% CI 83,0% - 92,7%)

EMA positive Zöliakie-Patienten: 93

Krankheitskontrollen: 31

Gesunde normale Patienten: 61

Anderer tTG IgG ELISA

	Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	74	21	95
CELIAC tTG	31	184	215
IgG ELISA	105	205	310

Positiv Prozentsatz Übereinstimmung: 70,5% (95% CI 60,7% - 78,8%)

Negativ Prozentsatz Übereinstimmung: 89,8% (95% CI 84,6% - 93,4%)

Gesamt Prozentsatz Übereinstimmung: 83,2% (95% CI 78,5% - 87,1%)

EMA positive Zöliakie-Patienten: 166

Krankheitskontrollen: 53

Gesunde normale Patienten: 91

- B. Immulisa™ Celiac tTG ELISAs vs. EMA: Ergebnisse die durch Celiac tTG ELISAs erhalten werden, werden mit endomysiale Antikörper (EMA) Ergebnisse aus einem kommerziell verfügbaren IFA und einer gut charakterisierten klinische Population verglichen.

CD Population von EMA bestätigt

	Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	87	6	93
CELIAC tTG	1	91	92
IgA ELISA	88	97	185

Positiv Prozentsatz Übereinstimmung: 98,9% (95% CI 92,9% - 99,9%)

Negativ Prozentsatz Übereinstimmung: 93,8% (95% CI 86,5% - 97,5%)

Gesamt Prozentsatz Übereinstimmung: 96,2% (95% CI 92,1% - 98,3%)

EMA positive Zöliakie-Patienten: 93

EMA-IgA-positive Zöliakie-Probanden: 88

Zöliakie-Probanden mit IgA-Mangel: 5

Krankheitskontrollen: 31

Gesunde normale Patienten: 61

CD Population von EMA bestätigt

	Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	72	7	79
CELIAC tTG	6	191	197
IgG ELISA	78	198	276

Positiv Prozentsatz Übereinstimmung: 92,3% (95% CI 83,4% - 96,8%)

Negativ Prozentsatz Übereinstimmung: 96,5% (95% CI 92,6% - 98,4%)

Gesamt Prozentsatz Übereinstimmung: 95,3% (95% CI 91,9% - 97,4%)

EMA positive Zöliakie-Patienten: 132 (74 EMA IgG +)

Krankheitskontrollen: 53

Gesunde normale Patienten: 91

- C. Klinische Sensitivität und Spezifität: Gut charakterisierte klinische CD-Populationen wurden mit Zöliakie-tTG-ELISAs geprüft und brachten die folgenden Resultate hervor.

Zöliakie

	Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	88	5	93
CELIAC tTG	5	87	92
IgA ELISA	93	92	185

Geschätzte Sensitivität: 94,6% (95% CI 87,3% - 98,0%)

Geschätzte Genauigkeit: 94,6% (95% CI 87,2% - 98,0%)

Übereinstimmung: 94,6% (95% CI 90,0% - 97,2%)

EMA IgA positive Zöliakie-Patienten: 88

Zöliakie-Probanden mit IgA-Mangel: 5

DE

Krankheitskontrollen: 31

Gesunde normale Patienten: 61

CD ohne IgA-Mangel

	Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO Positiv	87	0	87
CELIAC tTG Negativ	1	0	1
IgA ELISA Gesamt	88	0	88

Geschätzte Sensitivität: 98,9% (95% CI 92,9% - 99,9%)

Geschätzte Genauigkeit: --

Übereinstimmung: 98,9% (95% CI 92,9% - 99,9%)

EMA IgA positive Zöliakie-Patienten: 88

Krankheitskontrollen: 0

Gesunde normale Patienten: 0

Zöliakie

	Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO Positiv	72	7	79
CELIAC tTG Negativ	60	137	197
IgG ELISA Gesamt	132	144	276

Geschätzte Sensitivität: 54,5% (95% CI 45,7% - 63,2%)

Geschätzte Genauigkeit: 95,1% (95% CI 89,9% - 97,9%)

Übereinstimmung: 75,7% (95% CI 70,1% - 80,6%)

EMA positive Zöliakie-Patienten: 132 (74 EMA IgG +)

Krankheitskontrollen: 53

Gesunde normale Patienten: 91

CD mit IgA-Mangel

	Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO Positiv	21	0	21
CELIAC tTG Negativ	1	0	1
IgG ELISA Gesamt	22	0	22

Geschätzte Sensitivität: 95,5% (95% CI 75,1% - 99,8%)

Geschätzte Genauigkeit: --

Übereinstimmung: 95,5% (95% CI 75,1% - 99,8%)

CD-Probanden mit IgA-Mangel: 22

Krankheitskontrollen: 0

Gesunde normale Patienten: 0

- C. Kreuzreaktivität: Insgesamt 63 potentiell kreuzreaktive Proben von Individuen mit anderen autoimmunen Krankheiten oder positiv auf andere Antikörper wurden auf tTG-Antikörper getestet mit dem ImmuLisa™ Celiac tTG System.

Kondition	n	IgA Positiv n (%)	IgG Positiv n (%)
Basedowkrankheit	11	0 (0%)	0 (0%)
Hashimoto's Thyroiditis	10	0 (0%)	0 (0%)
ANA positiv*	9	0 (0%)	1 (11%)
CCP positiv**	10	0 (0%)	0 (0%)
RF positiv***1	10	0 (0%)	0 (0%)
Ulzerativer Colitis	5	0 (0%)	0 (0%)
Crohn's Krankheit	9	0 (0%)	2 (22%)
Gesamt	63	0 (0%)	3 (5%)

* Antinukleare Antikörper

** Cyclic Citrullinated Peptides Antikörper

*** Rheumatoid Factor Antibodies

DE

Genauigkeit

Die Genauigkeit wurde mithilfe mehrerer Proben getestet, die aus der gesamten Bandbreite des Versuchs ausgewählt wurden. Drei Durchläufe der Untersuchung wurden ausgeführt, an verschiedenen Tagen, um die Ergebnisse zwischen den Tagen zu bestimmen. Ein zusätzlicher Durchlauf von zehn Replikaten wurde durchgeführt, um die Wiederholungsrate zu bestimmen. Die Ergebnisse finden Sie unten.

Set	S #	Mittel (EU/ml)	Gesamt Ungenauigkeit		Zwischen Tagen		Innerhalb Test (Wiederholbarkeit)	
			SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
Celiac tTG IgA	1	10,6	1,086	10,2%	1,135	10,7%	1,095	10,2%
	2	20,4	1,224	6,0%	1,476	7,2%	0,956	4,7%
	3	25,0	1,496	6,0%	1,740	6,9%	1,271	5,1%
	4	34,9	2,075	5,9%	2,099	6,1%	2,110	6,0%
	5	48,7	2,634	5,4%	3,661	7,5%	1,090	2,2%
	6	110,6	4,008	3,6%	4,221	3,8%	3,960	3,6%
	7	134,7	7,253	5,4%	8,728	6,5%	5,904	4,4%
	8	183,7	6,161	3,4%	6,606	3,6%	5,615	3,0%
Celiac tTG IgG	1	15,3	1,100	7,2%	1,283	8,3%	0,929	6,1%
	2	24,3	1,727	7,1%	2,101	8,6%	1,355	5,6%
	3	29,8	1,931	6,5%	2,492	8,4%	1,289	4,3%
	4	60,5	3,046	5,0%	3,647	6,0%	2,507	4,1%
	5	99,1	4,720	4,8%	5,687	5,7%	3,756	3,8%
	6	233,7	10,022	4,3%	11,918	5,0%	7,108	3,1%
	7	263,5	13,061	5,0%	14,124	5,4%	11,794	4,4%

Beschränkung der Erkennung

Die Beschränkung der Erkennung (LoD) wurde basierend auf 60 Replikaten des Leerversuchs und 10 Replikaten der jeweiligen 6 niedrigststufigen (NHS) Proben bestimmt. LoD für IgA war 4,0 EU/ml. LoD für IgG war 2,9 EU/ml.

Linearität und Erholung

Linearität und Erholung wurden getestet durch verdünnte positive Proben durch die Bandbreite des Versuchs in äquidistanten Verdünnungen und den Vergleich tatsächlicher und erwarteter Ergebnisse. Der lineare Bereich der Versuche wurde als 4,0 (LoD) festgelegt – 160 EU/ml für IgA und 2,9 (LoD) – 260 EU/ml für IgG. Die Ergebnisse finden Sie unten:

Testmethode Bandbreite (EU/ml)	Slope (95% CI)	Y-Abfang (95% CI)	R ²	% Wiederherstellung (erhalten/erwartet)
IgA				
6,0 bis 62,7	0,932 (0,879 bis 0,985)	0,926 (-1,240 bis 3,091)	0,9943	97,9 bis 108,3
3,0 bis 157,0	0,947 (0,892 bis 1,002)	0,999 (-4,347 bis 6,345)	0,9979	94,5 bis 107,7
3,3 bis 163,6	0,910 (0,824 bis 0,957)	3,239 (-1,628 bis 8,106)	0,9946	85,0 bis 109,5
IgG				
3,0 bis 41,9	0,987 (0,970 bis 1,004)	0,405 (-0,037 bis 0,847)	0,9997	93,5 bis 101,2
2,7 bis 67,6	0,976 (0,839 bis 1,112)	4,303 (-0,854 bis 9,459)	0,9801	77,6 bis 100,1
2,9 bis 260,5	0,800 (0,648 bis 0,951)	11,6 (-9,4 bis 32,6)	0,9693	85,6 bis 122,0

Interferenz

Interferenz wurde durch Mischen von Seren mit bekannten tTG-Antikörperspiegeln mit sich potenziell gegenseitig beeinflussenden Serumproben und der Abweichung von erwarteten Resultaten studiert. Es wurde für die folgenden Substanzen bei den angezeigten Spiegeln keine bedeutende Interferenz demonstriert: Hämoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 µmol/L) und Rheumafaktor (100 EU/ml).

ImmulinTM

Cœliaque tTG

Anticorps anti-transglutaminase du tissu ELISA**IVD** Pour utilisation avec diagnostic *in vitro***ENCART DE PRODUIT****REF** 5144A Cœliaque tTG IgA ELISA 96 mesures**REF** 5144G Cœliaque tTG IgG ELISA 96 mesures**APPLICATION**

Immunoessais associés aux enzymes pour une détection qualitative et semi-quantitative des anticorps anti-transglutaminase du tissu (ELISA) IgA ou IgG dans le sérum humain pour aider au diagnostic de la maladie cœliaque (CD) / aux entropies sensibles au gluten en conjonction avec les autres résultats cliniques et de laboratoires.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La maladie cœliaque (CD) est un trouble gastro-intestinal auto-immunitaire qui se produit chez les individus génétiquement susceptibles et qui est activé par l'ingestion de céréales contenant du gluten telles que le blé, l'orge et le son. Les symptômes classiques de la CD sont la diarrhée, la perte de poids et la malnutrition. Seul un faible pourcentage de patients atteints de la CD présente des symptômes classiques. En conséquence, le spectre clinique de la CD s'est plus largement agrandi que dans le passé pour inclure les patients qui ne présentent pas les symptômes classiques. Il n'est pas rare que les symptômes initiaux ne soient pas gastro-intestinaux ou que les symptômes gastro-intestinaux, s'il y en a, soient légers ou intermittents. Le besoin d'examiner une gamme de présentations cliniques plus étendue a amené le diagnostic d'un plus grand nombre d'individus avec la CD plus tard au cours de leur vie qu'auparavant. Les adultes peuvent présenter des déficiences, des anémies macrocytiques et de l'hypocalcémie.

Les études ont révélé que la prévalence de la CD était fortement variable. Si les critères cliniques seuls sont utilisés pour déterminer la prévalence, l'incidence de la CD est bien plus faible en comparaison avec l'incidence établie par les méthodes sérologiques.^{1,2} En utilisant les méthodes sérologiques, les études récentes ont indiqué que l'incidence de la CD dans la population générale est entre un pour 100 et un pour 500.

Le non-diagnostic précoce de la CD peut prédisposer un individu à des complications à long terme telles que l'atrophie splénique et le lymphome intestinal.^{3,4} Un régime sans gluten (RSG) normalise la muqueuse et aide à réduire le potentiel malin.

L'examen histologique de la biopsie du petit intestin reste l'étalon d'or du diagnostic de la CD, mais il a ses propres limites. Ceci comprend certains patients avec une CD latente ou même active qui peuvent avoir une histopathologie normale.⁵

Les critères révisés de la Société européenne de gastroentérologie, hépatologie et nutrition pédiatriques (ESPGHAN) ne comprennent qu'une simple biopsie avec une rémission claire des symptômes physiques avec un RSG.⁶ La sérologie positive au moment du diagnostic avec disparition suite au RSG contribue au diagnostic. Les divers tests sérologiques employés dans le traitement conclusif des patients suspectés être atteints de la CD comprennent les tests d'anticorps anti-gliadine (AGA), anti-endomysium (EMA) et anti-transglutaminase du tissu (tTG). Les anticorps anti-gliadine et tTG sont détectés par ELISA, alors que les EMA sont détectés par l'immunofluorescence indirecte. Les EMA sont des indicateurs spécifiques de la CD. Toutefois, les tests des EMA sont une méthode immuno-histochimique qui demande de l'expérience dans la lecture des réactions immuno-fluorescentes.⁷

Depuis l'identification des tTG comme l'antigène endomysium, les méthodes ELISA ont été décrites pour détecter les anticorps dans le sérum sanguin des patients atteint par la CD. L'avantage de l'analyse d'anticorps anti-tTG est qu'elle est automatisable et moins subjective que l'EMA. Pour cette raison, de nombreux

FR

laboratoires ont choisi d'utiliser la méthode des anticorps tTG comme méthode de dépistage. Immulisa™ cœliaque tTG est un immunoessai unique utilisant une chimie spéciale pour détecter les anticorps anti-tTG avec un haut degré de spécificité et de sensibilité et elle minimise la détection d'anticorps non spécifiques dans d'autres résolutions de maladie comme cela a été rapporté dans certains autres immunoessais tTG.⁸⁻¹¹

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Le test est effectué sur immunoessais de phase solide. Les micropuits sont enduits d'antigène anti-transglutaminase du tissu humain recombiné suivi par une étape de blocage pour réduire la ligature de protéines non spécifiques pendant l'analyse. Les régulations, les calibreurs et les sérums sanguins des patients sont incubés dans les puits d'antigène enduits pour permettre aux anticorps spécifiques présents dans le sérum de se lier à l'antigène tTG. Les anticorps non liés et les autres protéines du sérum sont enlevés par lavage des micropuits. Les anticorps liés sont détectés en ajoutant une enzyme étiquetée IgA anti-humain ou conjugué IgG aux micropuits. Le conjugué non lié est enlevé par lavage. Le substrat enzymatique spécifique (TMB) est ensuite ajouté aux puits et la présence des anticorps est détectée par un changement de couleur produit par la conversion du substrat TMB à un réactif coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnelle à la concentration des anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 450 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA par millilitre (EU/ml) et rapportés comme positifs ou négatifs.

RÉACTIFS

Stockage et préparation

Stockez tous les réactifs entre 2 et 8°C. **A ne pas congeler.** Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration lorsqu'ils sont stockés et manipulés comme indiqué.

A ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant utilisation.

Réhydratez le tampon à eau jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée ou déminéralisée. Lorsque stocké entre 2 et 8°C, le tampon à eau réhydraté est stable jusqu'à la date d'expiration du kit.

Les lamelles enduites des micro-récipients sont pour un usage unique. Les lamelles de micro-récipients non utilisées doivent être réapposés avec précaution dans le sachet contenant les déshydratants pour empêcher une condensation et stockés entre 2 et 8°C.

Précautions

Toutes les composantes à dérivée humaine utilisées ont été testées pour HBsAg, HCV, HIV-1 et 2 et HTLV-I et tous les tests requis par la FDA sont revenus négatifs. Toutefois, les dérivés de sang humain et les spécimens des patients doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire en matière de stockage, de distribution et d'élimination de ces matériaux.¹²

Les instructions doivent être suivies exactement comme elle apparaissant dans cet encart afin d'assurer des résultats valides. Ne pas échanger les composantes de ce kit avec celles d'autres sources. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire afin de minimiser la contamination microbienne et croisée des réactifs lors de la manipulation. Ne pas utiliser de composantes du kit au-delà de la date d'expiration indiquée sur les étiquettes.

Matériaux fournis

Immulisa™ cœliaque tTG IgA ELISA

REF 5144A

Immulisa™ cœliaque tTG IgG ELISA

REF 5144G

Les kits contiennent suffisamment de réactifs pour effectuer 96 mesures.

12 x 8

MICROPLATE **CiTG**

Microplaque avec micropuits détachables individuels Enduite de tTG humain recombiné. Prêt à l'emploi.

1 x 1.75 ml

CONTROL+**CiTG-A**

Régulation positive prête à l'emploi (*capuchon rouge*) pour **REF** 5144A. Contient du sérum humain positif pour les anticorps IgA tTG. La gamme de concentration attendue en EU/ml est imprimée sur l'étiquette.

1 x 1.75 ml

CONTROL+**CiTG-G**

Régulation positive prête à l'emploi (*capuchon rouge*) pour **REF** 5144G. Contient du sérum humain positif pour les anticorps IgG tTG. La gamme de concentration attendue en EU/ml est imprimée sur l'étiquette.

1 x 1.75 ml

CONTROL-

Régulation négative prête à l'emploi (*capuchon blanc*). Contient du sérum humain.








FR

5 x 1.75 ml	<u>CALIBRATOR A C tG-A</u> <u>CALIBRATOR B C tG-A</u> <u>CALIBRATOR C C tG-A</u> <u>CALIBRATOR D C tG-A</u> <u>CALIBRATOR E C tG-A</u>	Jeu de 5 calibres prêts à l'emploi pour <u>REF</u> 5144A. Calibreur A (<i>capuchon vert</i>) 160 EU/ml, Calibreur B (<i>capuchon violet</i>) 80 EU/ml, Calibreur C (<i>capuchon bleu</i>) 40 EU/ml, Calibreur D (<i>capuchon jaune</i>) 20 EU/ml, et Calibreur E (<i>capuchon orange</i>) 1 EU/ml. Dérivé de sérum humain contenant des anticorps tTG IgA. Les concentrations en EU/ml sont imprimées sur les étiquettes.
5 x 1.75 ml	<u>CALIBRATOR A C tG-G</u> <u>CALIBRATOR B C tG-G</u> <u>CALIBRATOR C C tG-G</u> <u>CALIBRATOR D C tG-G</u> <u>CALIBRATOR E C tG-G</u>	Jeu de 5 calibres prêts à l'emploi pour <u>REF</u> 5144G. Calibreur A (<i>capuchon vert</i>) 320 EU/ml, Calibreur B (<i>capuchon violet</i>) 80 EU/ml, Calibreur C (<i>capuchon bleu</i>) 40 EU/ml, Calibreur D (<i>capuchon jaune</i>) 20 EU/ml, et Calibreur E (<i>capuchon orange</i>) 1 EU/ml. Dérivé de sérum humain contenant des anticorps tTG IgG. Les concentrations en EU/ml sont imprimées sur les étiquettes.
1 x 15 ml	<u>IgA-CONJ HRP</u>	Conjugué anticorps de chèvre anti-IgA humaines pour <u>REF</u> 5144A. Prêt à l'emploi.
1 x 15 ml	<u>IgG-CONJ HRP</u>	Conjugué anticorps de chèvre anti-IgG humaines pour <u>REF</u> 5144G. Prêt à l'emploi.
1 x 60 ml	<u>DIL</u>	Diluant pour sérum. Prêt à l'emploi. Couleur de codage violet.
1 x 15 ml	<u>SUBSTRATE TMB</u>	Substrat d'enzyme : TMB Prêt à l'emploi. Protéger de la lumière.
1 x 15 ml	<u>STOP H2SO4</u>	Solution d'arrêt*. Prêt à l'emploi.
2 x fioles	<u>BUF WASH</u>	Tampon de lavage en poudre. Pour reconstituer un litre par sachet.
1 x		Feuilles de protocole

Composants optionnels

1 x 60ml BUF|WASH Tampon de lavage en liquide concentré. Réhydratez jusqu'à un litre.

Symboles utilisés sur les étiquettes

<u>LOT</u>	Numéro de Lot
<u>REF</u>	Numéro catalogue
<u>IVD</u>	Utilisation à diagnostic in vitro
	A utiliser avant :
	Température de stockage
	Consulter les instructions d'emploi
	Nombre de tests
	Fabricant
	Date de fabrication
	*Danger. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Provoque des lésions oculaires graves. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

Matériaux nécessaires mais non fournis

- Eau déminéralisée ou distillée
- Pissette en plastique pour contenir le tampon de lavage dilué
- Pipettes capables de distribuer entre 5 µl et 1000 µl
- Pointes de verre jetables
- Tubes à essai propres de 12 x 75 mm et portoir
- Compte-minutes

FR

- Serviettes en papier absorbantes
- Lecteur de microplaques capable de lire les valeurs d'absorbance à 450 nm. Si un lecteur de microplaques à double longueur d'onde est utilisé, le filtre de référence doit être configuré à 600-650 nm.
- Un laveur automatique de microplaques capable de distribuer 200 µl

COLLECTION ET MANIPULATION DES SPÉCIMENS

Seuls les spécimens de sérum doivent être utilisés lors de cette procédure. Des spécimens largement contaminés d'hématolyses, de lipémiques et de microbes peuvent interférer avec la réalisation du test et ne doivent pas être utilisés. Stockez les spécimens entre 2° et 8°C pour une période n'excédant pas une semaine. Pour un stockage plus long, les spécimens de sérum doivent être congelés. Evitez la congélation répétée et le dégel des échantillons. Il est recommandé de tester les spécimens congelés dans un délai d'un an.

PROCÉDURE

Notes de procédure

- Lire attentivement l'encart du produit avant de commencer l'analyse.
- Toutes les dilutions des échantillons des patients doivent être préparées avant de commencer l'analyse.
- Laisser les spécimens des patients et les réactifs de test s'équilibrer à la température ambiante avant de commencer la procédure de test. Il est suggéré de laisser les réactifs sur le banc de travail en dehors de leur boîte pendant 30 minutes avant d'être utilisés. Remettre immédiatement après utilisation tous les spécimens et réactifs non utilisés dans le réfrigérateur.
- Retirer les bandes de micropuits nécessaires du sachet et resceller avec soin le sachet afin d'empêcher la condensation dans les puits non utilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.
- **Une bonne technique de lavage est essentielle.** Si le lavage est effectué manuellement, un lavage adéquat est accompli en dirigeant un jet puissant du tampon de lavage avec une pipette à tête large sur l'ensemble de la microplaque. **Il est recommandé d'utiliser un laveur automatique de microplaques.**
- Utiliser une pipette multicanaux capable de distribuer simultanément 8 ou 12 puits. Ceci accélère la procédure et donne des temps d'incubation uniformes.
- Pour toutes les étapes, un contrôle attentif du temps est important. Le début de toutes les périodes d'incubation commence avec la complétion de l'addition du réactif.
- L'addition de tous les échantillons et réactifs doit être effectuée au même taux et suivant la séquence chronologique.

Méthode de test

Étape 1 Laisser tous les réactifs et spécimens s'équilibrer à température ambiante.

Étape 2 Annoter la feuille de protocole pour indiquer le positionnement des échantillons dans les puits. Il est de bonne pratique de laboratoire de dupliquer les échantillons.

Étape 3 Pour une **détermination qualitative**, n'utiliser que le calibre D (*fiolle avec le capuchon jaune*).

ou

Pour une **détermination semi-quantitative**, utiliser les calibreurs de A à E comme décrit dans l'exemple de mise en place ci-dessous.

	Qualitative			Semi-qualitative			
A	Vierge	S5	Etc.	A	Vierge	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	Contrôle	S7		C	Contrôle	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal D	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Étape 4 Préparer une dilution à **1 : 101** des échantillons du patient en mélangeant **5 µl** du sérum sanguin du patient à **500 µl** de diluant pour sérum.

FR

Étape 5 Retirer les micropuits nécessaires du sachet et remettre les bandes non utilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer de manière sécurisée les micropuits dans le support supplémentaire fourni.

Étape 6 Pipette de **100 µl** des calibres, des régulations positives et négatives prêtes à utiliser et des échantillons patients dilués (**1 : 101**) dans les micropuits appropriés suivant la feuille de protocole.

Remarque : Inclure un puits contenant **100 µl** de diluant pour sérum comme réactif vierge. Mettre l'ELISA à zéro par rapport à ce réactif vierge.

Étape 7 Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

Étape 8 Laver **4 fois** avec le tampon de lavage. Pour un lavage manuel, remplir chaque micropuits avec le tampon de lavage reconstitué. Vider le fluide en renversant et en tapotant chaque puits pour en faire sortir le liquide ou en aspirant chaque puits. Pour sécher à la fin du dernier lavage, renverser les bandes sur des serviettes en papier absorbantes et taper vigoureusement sur les puits. Pour les laveurs automatiques, programmer le laveur suivant les instructions du fabricant.

Étape 9 Pipette de **100 µl** de conjugué dans les micropuits.

Étape 10 Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

Étape 11 Laver tous les micropuits comme à l'étape 8.

Étape 12 Pipette de **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque micropuits dans le même ordre et la même chronométrie que pour le conjugué.

Étape 13 Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

Étape 14 Pipette de **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque micropuits en utilisant le même ordre et la même chronométrie que pour le substrat d'enzymes. Lire les valeurs d'absorbance dans les **30 minutes** de l'addition de la solution d'arrêt.

Étape 15 Lire l'absorbance de chaque micropuits à **450 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à longueur d'onde simple ou à 450 / 630 nm avec un lecteur de microplaques à longueur d'onde double par rapport au réactif vierge définissant le zéro d'absorbance.

Contrôle de la qualité

Les calibres, les résolutions positives et négatives et un réactif vierge doivent être utilisés pour chaque analyse afin de vérifier l'intégrité et la précision du test. Le résultat d'absorbance du réactif vierge doit être $< 0,3$. Le calibre A ne doit pas avoir un résultat d'absorbance inférieur à 1,0, sinon le test doit être répété. La résolution négative doit être < 10 EU/ml. Si le test est effectué en dupliqué, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer EU/ml. Lors de la performance des déterminations qualitatives, la densité optique du calibre D doit être supérieure à celle de la résolution négative et inférieure à celle de l'absorbance de la résolution positive. Pour les déterminations semi-quantitatives, la résolution positive doit donner des valeurs dans la gamme figurant sur la fiole.

RÉSULTATS

Calculs

Les concentrations des échantillons du patient peuvent être déterminées par n'importe laquelle des deux méthodes suivantes :

1. DÉTERMINATION QUALITATIVE

Abs. d'échantillon témoin

----- X EU/ml de calibre D = EU/ml échantillon témoin

Abs. de calibre D

Il est recommandé que les résultats qualitatifs soient signalés comme « positif » ou « négatif ». Les résultats d'échantillon supérieurs ou égaux au calibre D sont considérés comme positifs.

2. DÉTERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Tracer l'absorbance des calibres de A à E en fonction de leur concentration respective sur papier millimétré linéaire. Tracer les concentrations en EU/ml sur l'axe des abscisses et l'absorbance sur l'axe des ordonnées et dessiner une courbe point à point. Déterminer les concentrations des échantillons du patient à partir de la courbe suivant les valeurs d'absorbance correspondantes. Comme alternative, une courbe à quatre paramètres peut être utilisée pour tracer une courbe standard.

FR

Il est recommandé que les résultats semi-quantitatifs soient signalés comme « positif », « négatif » ou « indéterminé » avec les valeurs unitaires EU/ml. Les résultats indéterminés ou limite doivent être testés de nouveau et évalués selon d'autres méthodes de laboratoire.

Interprétation

Les valeurs d'interprétation ont été déterminées par le test de 114 spécimens de donneurs de sang normaux non atteints de la maladie de cœliaque. La moyenne des sujets normaux plus 2 écarts-type a été établie comme le point de coupure de l'analyse et a reçu une valeur arbitraire de 20 EU/ml. IMMCO suggère l'utilisation de la gamme de référence ci-dessous. Chaque laboratoire doit valider les valeurs d'analyse pour ses propres conditions.

Valeur absolue anti-tTG	Interprétation
<20 EU/ml	Négative
de 20 à 25 EU/ml	Indéterminée (limite)
>25 EU/ml	Positive

Calibreur

Les calibreurs prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et ils doivent être utilisés avec chaque test. Les échantillons de patients contenant de hauts niveaux d'anticorps peuvent avoir des valeurs supérieures à celles du calibreur A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, de tels spécimens doivent être encore plus dilués pour qu'ils tombent dans la gamme de la courbe du calibreur lors du nouveau test. Pour déterminer les valeurs EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Les spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou contaminés par des microbactéries peuvent interférer avec l'exécution du test et ils ne doivent pas être utilisés. Stocker les spécimens entre 2 ° et 8 °C pendant une semaine maximum. Pour un stockage à plus long terme, les spécimens de sérum doivent être congelés. Éviter la congélation et la décongélation des échantillons.

Les résultats des tests servent d'aide au diagnostic et doivent être considérés en conjonction avec d'autres résultats cliniques et de laboratoire.

VALEURS ATTENDUES

Il est attendu que les résultats des tests dans une population normale soient négatifs. Toutefois, comme l'incidence de la CD dans la population normale est d'environ 1 %, certains individus asymptomatiques apparemment sains peuvent tester positif aux anticorps tTG.

L'incidence et les niveaux des anticorps anti-tTG sont dépendants du statut du régime. Les niveaux de ces anticorps diminuent et deviendront éventuellement négatifs chez les patients atteints de la CD qui suivent un régime sans gluten. D'une manière similaire, les niveaux de ces anticorps augmentent et peuvent devenir positifs lorsque les patients atteints de la CD qui suivaient un régime sans gluten ingèrent un régime contenant du gluten.¹³⁻¹⁵ Les patients atteints de la CD mais qui ont une déficience en IgA seront positifs aux anticorps IgG anti-tTG. Dans ce cas, des études peuvent être faites pour confirmer que le patient a une déficience en IgA.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

L'utilité de l'ImmuLisa™ cœliaque tTG ELISA pour la détection des anticorps anti-gliadine a été évaluée en testant des spécimens de sérums à EMA positifs bien caractérisés de sujets susceptibles de souffrir de CD avec des sérums de résolutions de maladie et d'humains « normaux ». Ces spécimens ont aussi été testés sur des kits de test ELISA et d'immunofluorescence disponibles dans le commerce. Ces résultats sont résumés ci-dessous.

A. ImmuLisa™ cœliaque tTG ELISA vs. d'autres immunoessais tTG :

		Autre tTG IgA ELISA		
		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	74	19	93
CŒLIAQUE tTG	Négatif	2	90	92

FR

IgA ELISA	Total	76	109	185
Accord de pourcentage positif :	97,4% (95% IC 90,0% - 99,5%)			
Accord de pourcentage négatif :	82,6% (95% IC 73,9% - 88,9%)			
Accord de pourcentage global :	88,6% (95% IC 83,0% - 92,7%)			

Sujets atteints de CD avec EMA positive : 93
 Résolutions de maladie : 31
 Sujets normaux en bonne santé : 61

Autre tTG IgG ELISA

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	74	21	95
CŒLIAQUE tTG	Négatif	31	184	215
IgG ELISA	Total	105	205	310

Accord de pourcentage positif : 70,5% (95% IC 60,7% - 78,8%)
 Accord de pourcentage négatif : 89,8% (95% IC 84,6% - 93,4%)
 Accord de pourcentage global : 83,2% (95% IC 78,5% - 87,1%)

Sujets atteints de CD avec EMA positive : 166
 Résolutions de maladie : 53
 Sujets normaux en bonne santé : 91

B. Immulisa™ coélique tTG ELISA vs. EMA : Les résultats obtenus avec les coéliques tTG ELISA ont été comparés aux titres anticorps anti-endomysium (EMA) obtenus en utilisant des kits IFA disponibles dans le commerce et une population clinique bien caractérisée.

population atteinte de CD confirmée par EMA

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	87	6	93
CŒLIAQUE tTG	Négatif	1	91	92
IgA ELISA	Total	88	97	185

Accord de pourcentage positif : 98,9% (95% IC 92,9% - 99,9%)
 Accord de pourcentage négatif : 93,8% (95% IC 86,5% - 97,5%)
 Accord de pourcentage global : 96,2% (95% IC 92,1% - 98,3%)

Sujets atteints de CD avec EMA positive : 93
 Sujets coeliques positifs à l'EMA IgA: 88
 Sujets coeliques déficients en IgA: 5
 Résolutions de maladie : 31
 Sujets normaux en bonne santé : 61

population atteinte de CD confirmée par EMA

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	72	7	79
CŒLIAQUE tTG	Négatif	6	191	197
IgG ELISA	Total	78	198	276

Accord de pourcentage positif : 92,3% (95% IC 83,4% - 96,8%)
 Accord de pourcentage négatif : 96,5% (95% IC 92,6% - 98,4%)
 Accord de pourcentage global: 96,2% (95% IC 92,1% - 98,3%)

Sujets atteints de CD avec EMA positive : 132 (74 EMA IgG positive)
 Résolutions de maladie : 53
 Sujets normaux en bonne santé : 91

C. Sensibilité et spécificité clinique: des populations cliniques MC bien caractérisés ont été testés avec les ELISAs Coéliques tTG et ont donné les résultats suivants.

Maladie coélique

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	88	5	93
CŒLIAQUE tTG	Négatif	5	87	92
IgA ELISA	Total	93	92	185

FR

Sensibilité estimée : 94,6% (95% IC 87,3% - 98,0%)
Spécificité estimée : 94,6% (95% IC 87,2% - 98,0%)
Accord : 94,6% (95% IC 90,0% - 97,2%)

Sujets atteints de CD avec EMA IgA positive : 88

Sujets coeliques déficients en IgA: 5

Résolutions de maladie : 31

Sujets normaux en bonne santé : 61

MC déficiente non-IgA

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	87	0	87
CŒLIAQUE tTG	Négatif	1	0	1
IgA ELISA	Total	88	0	88

Sensibilité estimée : 98,9% (95% IC 92,9% - 99,9%)

Spécificité estimée : --

Accord : 98,9% (95% IC 92,9% - 99,9%)

Sujets atteints de CD avec EMA IgA positive : 88

Résolutions de maladie : 0

Sujets normaux en bonne santé : 0

Maladie coeliaque

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	72	7	79
CŒLIAQUE tTG	Négatif	60	137	197
IgG ELISA	Total	132	144	276

Sensibilité estimée : 54,5% (95% IC 45,7% - 63,2%)

Spécificité estimée : 95,1% (95% IC 89,9% - 97,9%)

Accord : 75,7% (95% IC 70,1% - 80,6%)

Sujets atteints de CD avec EMA positive : 132 (74 EMA IgG positive)

Résolutions de maladie : 53

Sujets normaux en bonne santé : 91

MC déficiente IgA

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	21	0	21
CŒLIAQUE tTG	Négatif	1	0	1
IgG ELISA	Total	22	0	22

Sensibilité estimée : 95,5% (95% IC 75,1% - 99,8%)

Spécificité estimée : --

Accord : 95,5% (95% IC 75,1% - 99,8%)

Sujets MC déficients IgA : 22

Résolutions de maladie : 0

Sujets normaux en bonne santé : 0

- D. Réactivité croisée : Un total de 63 spécimens à réaction potentiellement croisée d'individus avec d'autres troubles auto-immunitaires ou positifs à d'autres auto-anticorps ont été testés pour les anticorps tTG en utilisant le système ImmuLisa™ coeliaque tTG.

Condition	n	IgA Positif n (%)	IgG Positif n (%)
Maladie de Graves	11	0 (0 %)	0 (0 %)
Thyroïdite de Hashimoto	10	0 (0 %)	0 (0 %)
Positif aux ANA*	9	0 (0 %)	1 (11 %)
Positif aux AAC**	10	0 (0 %)	0 (0 %)
Positif au FR***	9	0 (0 %)	0 (0 %)
Rectocolite hémorragique	5	0 (0 %)	0 (0 %)

FR

Colite granulomateuse	9	0 (0 %)	2 (22 %)
Total	63	0 (0 %)	3 (5 %)

* Anticorps antinucléaires

** Anticorps antipeptides cycliques citrullinés

*** Anticorps de facteur rhumatoïde

Précision

La précision a été testée avec de multiples spécimens sélectionnés à travers la gamme de tests. Trois tests ont été effectués à différents jours pour déterminer les résultats entre les jours. Un test supplémentaire de dix dupliqués a été effectué pour déterminer la répétabilité. Les résultats sont résumés ci-dessous :

Kit	N° S	Moyenne (EU/ml)	Imprécision totale		Entre les jours		Au sein du test (répétabilité)	
			Écart- type (EU/ml)	% de val. cor.	Écart- type (EU/ml)	% de val. cor.	Écart- type (EU/ml)	% de val. cor.
Analyse cœliaque tTG IgA	1	10,6	1,086	10,2%	1,135	10,7%	1,095	10,2%
	2	20,4	1,224	6,0%	1,476	7,2%	0,956	4,7%
	3	25,0	1,496	6,0%	1,740	6,9%	1,271	5,1%
	4	34,9	2,075	5,9%	2,099	6,1%	2,110	6,0%
	5	48,7	2,634	5,4%	3,661	7,5%	1,090	2,2%
	6	110,6	4,008	3,6%	4,221	3,8%	3,960	3,6%
	7	134,7	7,253	5,4%	8,728	6,5%	5,904	4,4%
	8	183,7	6,161	3,4%	6,606	3,6%	5,615	3,0%
Analyse cœliaque tTG IgG	1	15,3	1,100	7,2%	1,283	8,3%	0,929	6,1%
	2	24,3	1,727	7,1%	2,101	8,6%	1,355	5,6%
	3	29,8	1,931	6,5%	2,492	8,4%	1,289	4,3%
	4	60,5	3,046	5,0%	3,647	6,0%	2,507	4,1%
	5	99,1	4,720	4,8%	5,687	5,7%	3,756	3,8%
	6	233,7	10,022	4,3%	11,918	5,0%	7,108	3,1%
	7	263,5	13,061	5,0%	14,124	5,4%	11,794	4,4%

Limite de détection

La limite de détection (LdD) a été déterminée sur la base de 60 mesures de l'échantillon vierge et 10 mesures chacun de 6 échantillons de bas niveau (NHS). La LdD pour IgA était de 4,0 EU/ml. La LdD pour IgG était de 2,9 EU/ml.

Linéarité et récupération

La linéarité et la récupération ont été testées en diluant les spécimens positifs à travers l'ensemble de l'analyse dans des solutions équidistantes et en comparant les résultats actuels aux résultats attendus. La gamme linéaire des analyses a été déterminée être de 4,0 (LdD) – 160 EU/ml pour IgA et 2,9 (LdD) – 260 EU/ml pour IgG. Les résultats sont résumés ci-dessous :

Gamme de test (EU/ml)	Pente (95 % d'IC)	Segment sur l'axe y (95 % D'IC)	R ²	% de récupération (obtenu / attendu)
IgA				
de 6,0 à 62,7	0,932 (de 0,879 à 0,985)	0,926 (de -1,240 à 3,091)	0,9943	de 97,9 à 108,3
de 3,0 à 157,0	0,947 (de 0,892 à 1,002)	0,999 (de -4,347 à 6,345)	0,9979	de 94,5 à 107,7
de 3,3 à 163,6	0,910 (de 0,824 à 0,957)	3,239 (de -1,628 à 8,106)	0,9946	de 85,0 à 109,5
IgG				
de 3,0 à 41,9	0,987 (de 0,970 à 1,004)	0,405 (de -0,037 à 0,847)	0,9997	de 93,5 à 101,2
de 2,7 à 67,6	0,976 (de 0,839 à 1,112)	4,303 (de -0,854 à 9,459)	0,9801	de 77,6 à 100,1
de 2,9 à 260,5	0,800 (de 0,648 à 0,951)	11,6 (de -9,4 à 32,6)	0,9693	de 85,6 à 122,0

Interférence

L'interférence a été étudiée en mélangeant le sérum avec des niveaux d'anticorps tTG connus avec des échantillons de sérum potentiellement interférant puis en étudiant la déviation par rapport aux résultats escomptés. Aucune interférence significative n'a été démontrée pour les substances suivantes aux niveaux indiqués : Hémoglobine (2 g/L), Bilirubine (342 $\mu\text{mol/L}$), et facteur rhumatoïde (100 EU/ml).

ImmuLisa™

Celiac tTG

ELISA per anticorpi anti-transglutaminasi tissutale umana ricombinante

IVD Per uso diagnostico *in vitro*

FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

REF	5144A	ELISA Celiac tTG IgA	96 determinazioni
REF	5144G	ELISA Celiac tTG IgG	96 determinazioni

USO PREVISTO

Dosaggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il rilevamento qualitativo e semiquantitativo degli anticorpi IgA o IgG anti-transglutaminasi tissutale umana nel siero umano per facilitare la diagnosi dell'enteropatia sensibile al glutine o malattia celiaca (CD) in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

La malattia celiaca (CD) è un disturbo gastrointestinale autoimmune che può colpire soggetti geneticamente sensibili ed è scatenato dall'ingestione di cereali contenenti glutine, come ad esempio grano, orzo e segale. La sindrome classica della CD include diarrea, perdita di peso e malnutrizione. Solo una piccola percentuale di pazienti con CD presenta i sintomi classici. Lo spettro clinico della CD si è quindi notevolmente ampliato rispetto al passato, includendo pazienti che non presentano i sintomi classici. È abbastanza comune che i sintomi iniziali non siano gastrointestinali o se lo sono siano lievi o intermittenti. La necessità di esaminare una gamma più ampia di presentazioni cliniche ha fatto aumentare sempre più il numero di soggetti con diagnosi di CD in età più avanzata. Gli adulti possono presentare carenza di ferro, anemia macrocitica e ipocalcemia.

Gli studi hanno scoperto che la prevalenza della CD è molto variabile. Se si utilizzano solo i criteri clinici per determinare la prevalenza, l'incidenza della CD è molto inferiore rispetto al valore stabilito in base ai metodi sierologici.^{1,2} Utilizzando questi metodi, studi recenti indicano che l'incidenza della CD nella popolazione generale sia compresa fra uno su 100 e uno su 500.

L'incapacità di diagnosticare precocemente la CD può predisporre un individuo alle complicanze a lungo termine come l'atrofia splenica e il linfoma intestinale.^{3,4} Una dieta priva di glutine (GFD) normalizza la mucosa e aiuta a ridurre il potenziale maligno.

L'esame istologico di un campione biotico del piccolo intestino resta lo standard di riferimento per la diagnosi di CD, sebbene abbia i suoi limiti. Questi includono alcuni pazienti con CD latente o persino attiva che possono avere un'istopatologia normale.⁵

I criteri riveduti dell'European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGHAN) includono una singola biopsia con evidente remissione dei sintomi clinici sotto GFD.⁶ La sierologia positiva all'epoca della diagnosi con la scomparsa sotto GFD contribuisce all'accertamento diagnostico. I vari test sierologici impiegati negli accertamenti diagnostici dei pazienti con CD sospetta includono i test per gli anticorpi anti-gliadina (AGA), anti-endomisio (EMA) e anti-transglutaminasi tissutale (tTG). Gli anticorpi anti-gliadina e anti-tTG sono rilevati mediante ELISA, mentre gli anti-EMA sono rilevati mediante immunofluorescenza indiretta. Gli anticorpi anti-EMA sono indicatori molto specifici della CD. Il test EMA è tuttavia un metodo immunostochimico che richiede esperienza nella lettura delle reazioni di immunofluorescenza.⁷

Da quando la tTG è stata identificata come antigene dell'endomisio, sono stati descritti metodi ELISA per la rilevazione anticorpale nei sieri dei pazienti con CD. Il vantaggio del dosaggio degli anticorpi anti-tTG è che si tratta di un metodo automatizzabile e meno soggettivo rispetto all'EMA. Per questa ragione, molti laboratori hanno scelto di usare il metodo anticorpale anti-tTG come metodo di screening. ImmuLisa™ Celiac tTG è un dosaggio immunoenzimatico unico che utilizza una chimica particolare per rilevare gli anticorpi anti-tTG con un

IT

grado elevato di specificità e sensibilità, minimizzando inoltre il rilevamento degli anticorpi non specifici in altri controlli di malattia come riportato in alcuni altri dosaggi immunoenzimatici tTG.⁸⁻¹¹

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il test viene eseguito come dosaggio immunoenzimatico in fase solida. I micropozzetti sono rivestiti con antigene transglutaminasi tissutale umana ricombinante, cui segue un passaggio bloccante per ridurre il legame non specifico durante la sessione di dosaggio. Controlli, calibratori e sieri del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti con l'antigene per consentire agli anticorpi specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene tTG. Gli anticorpi non legati e le altre proteine sieriche vengono rimossi tramite lavaggio dei micropozzetti. Gli anticorpi legati sono rilevati aggiungendo ai pozzetti un coniugato anti-IgA o anti-IgG umane marcate con enzima. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Si aggiunge quindi ai pozzetti un substrato enzimatico specifico (TMB) e la presenza degli anticorpi viene rilevata tramite una variazione cromatica prodotta dalla conversione del substrato TMB in un prodotto di reazione colorato. La reazione viene arrestata e l'intensità della variazione cromatica, che è proporzionale alla concentrazione anticorpale, viene letta con uno spettrofotometro a 450 nm. I risultati sono espressi in unità ELISA per millimetro (UE/ml) e riportati come positivi o negativi.

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. **Non congelare.** I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza, quando conservati e maneggiati secondo le indicazioni.

Non utilizzare se il reagente non è limpido o in presenza di un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'uso.

Ricostituire il tampone di lavaggio a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Quando conservato a 2-8 °C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Le strisce di micropozzetti rivestiti sono monouso. Le strisce di micropozzetti non utilizzate devono essere risigillate accuratamente in buste contenenti essiccanti per impedire la formazione di condensa e conservati a 2-8 °C.

Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi in base ai test richiesti dalla FDA. Gli emoderivati umani e i campioni dei pazienti devono essere tuttavia considerati potenzialmente infettivi. Seguire le buone pratiche di laboratorio durante la conservazione, la distribuzione e lo smaltimento di questi materiali.¹²

Per garantire la validità dei risultati, seguire le istruzioni esattamente come appaiono nel presente foglio illustrativo del kit. Non scambiare i componenti del kit con quelli di altre fonti. Seguire le buone pratiche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza segnata sulle etichette.

Materiali forniti

ELISA ImmuLisa™ Celiac tTG IgA REF 5144A
ELISA ImmuLisa™ Celiac tTG IgG REF 5144G

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 96 determinazioni.

12 x 8	MICROPLATE CtTG	Micropiastra con micropozzetti separabili singolarmente. Rivestiti con tTG umana ricombinante. Pronto per l'uso.
1 x 1.75 ml	CONTROL + CtTG-A	Pronto per l'uso Controllo positivo (tappo rosso) per REF 5144A. Contiene siero umano positivo per anticorpi IgA anti-tTG. L'intervallo di concentrazione previsto in UE/ml è stampato sull'etichetta.
1 x 1.75 ml	CONTROL + CtTG-G	Pronto per l'uso Controllo positivo (tappo rosso) per REF 5144G. Contiene siero umano positivo per anticorpi IgG anti-tTG. L'intervallo di concentrazione previsto in UE/ml è stampato sull'etichetta.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	Pronto per l'uso Controllo negativo (tappo bianco) . Contiene siero umano.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A CtTG-A CALIBRATOR B CtTG-A CALIBRATOR C CtTG-A	Pronto per l'uso Serie di 5 calibratori per REF 5144A. Calibratore A (tappo verde) 160 UE/ml, Calibratore B (tappo viola) 80 UE/ml, Calibratore C (tappo blu) 40 UE/ml, Calibratore D (tappo giallo) 20 UE/ml, e Calibratore E (tappo arancione) 1 UE/ml. Derivato da siero

IT

		umano contenente anticorpi IgA anti-tTG. Le concentrazioni in UE/ml sono stampate sulle etichette.
5 x 1.75 ml		Pronto per l'uso Serie di 5 calibratori per 5144G. Calibratore A (<i>tappo verde</i>) 320 UE/ml, Calibratore B (<i>tappo viola</i>) 80 UE/ml, Calibratore C (<i>tappo blu</i>) 40 UE/ml, Calibratore D (<i>tappo giallo</i>) 20 UE/ml, e Calibratore E (<i>tappo arancione</i>) 1 UE/ml. Derivato da siero umano contenente anticorpi IgG anti-tTG. Le concentrazioni in UE/ml sono stampate sulle etichette.
1 x 15 ml		Coniugato HRP di montone anti-IgA umane per 5144A. Pronto per l'uso.
1 x 15 ml		Coniugato HRP di montone anti-IgG umane per 5144G. Pronto per l'uso.
1 x 60 ml		Diluyente per siero. Pronto per l'uso. Colore codificato porpora.
1 x 15 ml		Substrato enzimatico TMB. Pronto per l'uso. Proteggere dalla luce.
1 x 15 ml		Soluzione di arresto*. Pronto per l'uso.
2 x flaconcini		Tampone di lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.
1 x		Schede del protocollo

Componenti facoltativi

1 x 60ml		Tampone di lavaggio concentrato liquido. Ricostituire a un litro.
----------	--	---

Simboli utilizzati sulle etichette

	Codice del lotto
	Numero di catalogo
	Per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Utilizzare entro
	Temperatura di conservazione
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Numero di test
	Fabbricante
	Data di fabbricazione
	*Pericolo. Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Provoca gravi lesioni oculari. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

Materiali necessari ma non inclusi

- Acqua deionizzata o distillata
- Flacone morbido per conservare il tampone di lavaggio diluito
- Pipette con capacità di erogazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso per pipette
- Provette pulite 12 x 75 mm e rastrelliera per provette
- Contaminuti
- Fogli di carta assorbente
- Lettore per micropiastre capace di leggere i valori di assorbanza a 450 nm. Se è disponibile un lettore per micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm
- Lavatrice automatica per micropiastre capace di erogare 200 µl

PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare solo campioni di siero. I campioni che mostrano emolisi macroscopica, lipemia o contaminazione microbica possono interferire con le prestazioni del test e non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a 2-8 °C per una settimana al massimo. Per conservazioni più prolungate, congelare i campioni di siero. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni. Si raccomanda di analizzare i campioni congelati entro un anno.

PROCEDURA

Note sulla procedura

- Prima di iniziare il dosaggio, leggere attentamente il foglio illustrativo del prodotto.
- Tutte le diluizioni dei campioni del paziente vanno preparate prima di iniziare il dosaggio.
- Prima di avviare la procedura del test, attendere che i campioni del paziente e i reagenti del test abbiano raggiunto la temperatura ambiente. Prima dell'uso, si consiglia di lasciare i reagenti sul piano di lavoro e fuori dalla scatola per 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso, rimettere nel frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
- Rimuovere le strisce di micropozzetti necessarie dalla busta e risigillare accuratamente quest'ultima per evitare la formazione di condensa nei pozzetti non utilizzati. Rimettere immediatamente la busta nel frigorifero.
- **È fondamentale una tecnica di lavaggio valida.** Se il lavaggio viene effettuato manualmente, è adeguato se viene eseguito dirigendo un energico getto di tampone di lavaggio con un flacone di lavaggio a bocca larga sull'intera micropiastre. **Si raccomanda l'uso di una lavatrice automatica per micropiastre.**
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di riempire 8 o 12 pozzetti allo stesso tempo. Ciò accelera il lavoro e fornisce tempi di incubazione più uniformi.
- Per tutti i passaggi è importante controllare accuratamente i tempi. L'inizio di tutti i periodi di incubazione corrisponde al completamento dell'aggiunta del reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e i reagenti deve avvenire alla stessa velocità e con la stessa sequenza.

Metodo del test

Passaggio 1 Attendere che tutti i reagenti e i campioni raggiungano la temperatura ambiente.

Passaggio 2 Etichettare la scheda del protocollo per indicare l'inserimento del campione nei pozzetti. La buona pratica di laboratorio richiede di analizzare i campioni in duplicato.

Passaggio 3 Per una **determinazione qualitativa** utilizzare solo il Calibratore D (*flaconcino con tappo giallo*).

oppure

Per una **determinazione semiquantitativa** utilizzare i Calibratori da A fino ad E come illustrato nel seguente schema esemplificativo.

Qualitativa				Semiquantitativa			
A	Bianco	S5	Ecc.	A	Bianco	S1	Ecc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+ Controllo	S7		C	+ Controllo	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Passaggio 4 Preparare una diluizione **1:101** dei campioni del paziente mescolando **5 µl** dei sieri del paziente con **500 µl** di Diluente per siero.

Passaggio 5 Rimuovere i micropozzetti richiesti dalla busta e rimettere nel frigorifero le strisce non utilizzate nella busta sigillata. Posizionare perfettamente i micropozzetti nel supporto aggiuntivo fornito.

IT

Passaggio 6 Pipettare **100 µl** dei calibratori pronti all'uso, dei controlli positivo e negativo e dei campioni del paziente diluiti (**1:101**) nei micropozzetti appropriati come indicato nella scheda del protocollo.

Nota: includere un pozzetto contenente **100 µl** del Diluente per siero come reagente bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il reagente bianco.

Passaggio 7 Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Passaggio 8 Lavare **4x** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ogni micropozzetto con tampone di lavaggio ricostituito. Gettare il fluido presente nei pozzetti invertendo questi ultimi e picchiettandone il fondo oppure aspirando il liquido contenuto. Per l'asciugatura al termine dell'ultimo lavaggio, invertire le strisce e picchiettare energicamente i pozzetti su fogli di carta assorbente. Per le lavatrici automatiche, programmare la macchina in base alle istruzioni del produttore.

Passaggio 9 Pipettare **100 µl** di Coniugato nei micropozzetti.

Passaggio 10 Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Passaggio 11 Lavare tutti i micropozzetti come nel Passaggio 8.

Passaggio 12 Pipettare **100 µl** di Substrato enzimatico in ogni micropozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi del Coniugato.

Passaggio 13 Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Passaggio 14 Pipettare **100 µl** di Soluzione di arresto in ogni micropozzetto utilizzando lo stesso ordine e gli stessi tempi del Substrato enzimatico. Leggere i valori di assorbanza entro **30 minuti** dall'aggiunta della Soluzione di arresto.

Passaggio 15 Leggere l'assorbanza di ogni micropozzetto a **450 nm** utilizzando un lettore per micropiastre a lunghezza d'onda singola o doppia (450/630 nm) contro il reagente bianco impostato ad assorbanza zero.

Controllo di qualità

Analizzare in ogni dosaggio i calibratori, i controlli positivo e negativo e il reagente bianco per verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza per il reagente bianco deve essere $< 0,3$. Il Calibratore A deve avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti il test deve essere ripetuto. Il Controllo negativo deve essere < 10 UE/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, calcolare la media di due letture per determinare il valore in UE/ml. Durante l'esecuzione delle determinazioni qualitative, la densità ottica del Calibratore D deve essere superiore a quella del controllo negativo e inferiore all'assorbanza del controllo positivo. Per le determinazioni semiquantitative, il Controllo positivo deve fornire valori compresi nell'intervallo dichiarato sul flaconcino.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere stabilite con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

Ass. Campione test

----- X UE/ml del Calibratore D = UE/ml Campione test

Ass. Calibratore D

Si raccomanda di refertare i risultati qualitativi come "positivi" o "negativi". Risultati del campione superiori o pari al calibratore D sono considerati positivi.

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare su carta millimetrata lineare-logaritmica l'assorbanza dal Calibratore A fino al Calibratore E rispetto alle rispettive concentrazioni. Tracciare le concentrazioni in UE/ml sull'asse X rispetto all'assorbanza sull'asse Y e disegnare un adattamento della curva punto-punto. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva in base ai valori di assorbanza corrispondenti. In alternativa, per tracciare la curva standard è possibile utilizzare una curva a quattro parametri.

Si raccomanda di refertare i risultati semiquantitativi come "positivi", "negativi" o "indeterminati" con i valori delle unità in UI/ml. In presenza di risultati indeterminati/borderline, ripetere il test e valutare unitamente ad altri metodi di laboratorio.

Interpretazione

I valori di interpretazione sono stati determinati testando 114 donatori di sangue normali e campioni di controllo senza malattia celiaca. Come cutoff del dosaggio è stata stabilita la media dei soggetti normali più 2 DS (deviazione standard) ed è stato assegnato un valore arbitrario di 20 UE/ml. IMMCO suggerisce l'uso dell'intervallo di riferimento riportato di seguito. Ogni laboratorio deve convalidare i valori del dosaggio in base alle proprie condizioni.

Val. antic. anti-tTG	Interpretazione
<20 UE/ml	Negativo
20-25 UE/ml	Indeterminato (borderline)
>25 UE/ml	Positivo

Calibratore

Utilizzare in ogni sessione i calibratori pronti all'uso inclusi per fornire una determinazione semiquantitativa. Campioni del paziente contenenti livelli anticorpali elevati possono fornire valori di assorbanza superiori a quello del Calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, questi campioni devono essere ulteriormente diluiti in modo da rientrare nell'intervallo della curva del calibratore alla ripetizione del test. Per determinare i valori UE/ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

LIMITI DELLA PROCEDURA

In questa procedura, utilizzare solo campioni di siero. I campioni con emolisi macroscopica, lipemia o contaminazione batterica possono interferire con le prestazioni del test e non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a da 2-8 °C per una settimana al massimo. Per conservazioni più lunghe, congelare i campioni di siero. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni.

I risultati del test facilitano la diagnosi e devono essere considerati unitamente ad altri riscontri clinici e di laboratorio.

VALORI ATTESI

I risultati del test attesi in una popolazione normale sono solitamente negativi. Tuttavia, dato che l'incidenza della CD nella popolazione normale è di circa l'1%, alcuni soggetti apparentemente sani e asintomatici possono risultare positivi al test per gli anticorpi anti-tTG.

L'incidenza e i livelli di anticorpi anti-tTG dipendono dallo stato della dieta. I livelli di questi anticorpi diminuiscono e finiscono per diventare negativi nei pazienti con CD sotto dieta priva di glutine. Analogamente, i livelli di questi anticorpi aumentano e possono diventare positivi quando i pazienti con CD sotto dieta priva di glutine ingeriscono una dieta che lo contiene.¹³⁻¹⁵ I pazienti affetti da CD ma carenti di IgA saranno positivi per gli anticorpi IgG anti-tTG. In questi casi, si possono condurre studi per confermare la carenza di IgA del paziente.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

L'utilità dei test ELISA ImmuLisa™ Celiac tTG è stata valutata testando campioni di siero positivi per EMA ben caratterizzati da soggetti con CD sospetta accanto a controlli di malattia e sieri umani "normali". Questi campioni sono anche stati testati su kit ELISA e kit di analisi per immunofluorescenza commercialmente disponibili. Questi risultati sono riepilogati di seguito.

A. ELISA ImmuLisa™ Celiac tTG vs. altro dosaggio immunoenzimatico tTG:

		Altro ELISA IgA tTG		
		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	74	19	93
CELIAC tTG	Negativo	2	90	92
ELISA IgA	Totale	76	109	185

Concordanza percentuale positiva: 97,4% (95% IC 90,0% - 99,5%)

Concordanza percentuale negativa: 82,6% (95% IC 73,9% - 88,9%)

Concordanza percentuale totale: 88,6% (95% IC 83,0% - 92,7%)

Soggetti celiaci positivi per EMA: 93

Controlli di malattia: 31

Soggetti sani normali: 61

Altro ELISA IgG tTG

		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	74	21	95
CELIAC tTG	Negativo	31	184	215
ELISA IgG	Totale	105	205	310

Concordanza percentuale positiva: 70,5% (95% IC 60,7% - 78,8%)

Concordanza percentuale negativa: 89,8% (95% IC 84,6% - 93,4%)

Concordanza percentuale totale: 83,2% (95% IC 78,5% - 87,1%)

Soggetti celiaci positivi per EMA: 166

Controlli di malattia: 53

Soggetti sani normali: 91

B. ELISA ImmuLisa™ Celiac tTG vs. EMA: i risultati ottenuti con i test ELISA Celiac tTG sono stati confrontati con i risultati degli anticorpi anti-endomisio (EMA) ottenuti utilizzando un kit IFA commercialmente disponibile e una popolazione clinica ben caratterizzata.

Popolazione CD confermata mediante EMA

		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	87	6	93
CELIAC tTG	Negativo	1	91	92
ELISA IgA	Totale	88	97	185

Concordanza percentuale positiva: 98,9% (95% IC 92,9% - 99,9%)

Concordanza percentuale negativa: 93,8% (95% IC 86,5% - 97,5%)

Concordanza percentuale totale: 96,2% (95% IC 92,1% - 98,3%)

Soggetti celiaci positivi per EMA: 93

Soggetti celiaci positivi per EMA IgA: 88

Soggetti celiaci carenti di IgA: 5

Controlli di malattia: 31

Soggetti sani normali: 61

Popolazione CD confermata mediante EMA

		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	72	7	79
CELIAC tTG	Negativo	6	191	197
ELISA IgG	Totale	78	198	276

Concordanza percentuale positiva: 92,3% (95% IC 83,4% - 96,8%)

Concordanza percentuale negativa: 96,5% (95% IC 92,6% - 98,4%)

Concordanza percentuale totale: 95,3% (95% IC 91,9% - 97,4%)

Soggetti celiaci positivi per EMA: 132 (74 positivi per EMA IgG)

Controlli di malattia: 53

Soggetti sani normali: 91

C. Sensibilità e specificità clinica: popolazioni cliniche con CD ben caratterizzata sono state testate con ELISA Celiac tTG producendo i seguenti risultati.

Malattia celiaca

		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	88	5	93
CELIAC tTG	Negativo	5	87	92
IgA ELISA	Totale	93	92	185

Sensibilità stimata: 94,6% (95% IC 87,3% - 98,0%)

Specificità stimata: 94,6% (95% IC 87,2% - 98,0%)

Concordanza: 94,6% (95% IC 90,0% - 97,2%)

Soggetti celiaci positivi per EMA IgA: 88

Soggetti celiaci carenti di IgA: 5

Controlli di malattia: 31

Soggetti sani normali: 61

CD senza carenza di IgA

		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	87	0	87
CELIAC tTG	Negativo	1	0	1
IgA ELISA	Totale	88	0	88
Sensibilità stimata:		98,9% (95% IC 92,9% - 99,9%)		
Specificità stimata:		--		
Concordanza:		98,9% (95% IC 92,9% - 99,9%)		
Soggetti celiaci positivi per EMA IgA: 88				
Controlli di malattia: 0				
Soggetti sani normali: 0				

Malattia celiaca

		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	72	7	79
CELIAC tTG	Negativo	60	137	197
IgG ELISA	Totale	132	144	276
Sensibilità stimata:		54,5% (95% IC 45,7% - 63,2%)		
Specificità stimata:		95,1% (95% IC 89,9% - 97,9%)		
Concordanza:		75,7% (95% IC 70,1% - 80,6%)		
Soggetti celiaci positivi per EMA: 132 (74 positivi per EMA IgG)				
Controlli di malattia: 53				
Soggetti sani normali: 91				

CD con carenza di IgA

		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	21	0	21
CELIAC tTG	Negativo	1	0	1
IgG ELISA	Totale	22	0	22
Sensibilità stimata:		95,5% (95% IC 75,1% - 99,8%)		
Specificità stimata:		--		
Concordanza:		95,5% (95% IC 75,1% - 99,8%)		
Soggetti con CD carenti di IgA: 22				
Controlli di malattia: 0				
Soggetti sani normali: 0				

- E. Reattività crociata: 63 campioni totali con reattività crociata potenziale, provenienti da soggetti con altri disturbi immunitari o positivi per altri autoanticorpi, sono stati testati per gli anticorpi anti-tTG utilizzando il sistema Immulisa™ Celiac tTG.

Condizione	n	IgA Positivo n (%)	IgG Positivo n (%)
Malattia di Graves	11	0 (0%)	0 (0%)
Tiroidite di Hashimoto	10	0 (0%)	0 (0%)
ANA positivo*	9	0 (0%)	1 (11%)
CCP positivo**	10	0 (0%)	0 (0%)
RF positivo***	9	0 (0%)	0 (0%)
Colite ulcerativa	5	0 (0%)	0 (0%)
Morbo di Crohn	9	0 (0%)	2 (22%)
Totale	63	0 (0%)	3 (5%)

* Anticorpi antinucleari

** Anticorpi anti-peptidi citrullinati ciclici

*** Anticorpi del fattore reumatoide

IT

Precisione

La precisione è stata testata con campioni multipli selezionati attraverso l'intervallo del dosaggio. Sono state eseguite tre sessioni di dosaggio in giorni differenti per determinare i risultati tra i giorni. È stata eseguita un'altra sessione di dieci replicati per determinare la ripetibilità. I risultati sono riepilogati di seguito.

Kit	N, c	Media (UE/ml)	Imprecisione totale		Tra i giorni		Tra le sessioni (Ripetibilità)	
			DS (UE/ml)	CV%	DS (UE/ml)	CV%	DS (UE/ml)	CV%
Dosaggio IgA Celiac tTG	1	10,6	1,086	10,2%	1,135	10,7%	1,095	10,2%
	2	20,4	1,224	6,0%	1,476	7,2%	0,956	4,7%
	3	25,0	1,496	6,0%	1,740	6,9%	1,271	5,1%
	4	34,9	2,075	5,9%	2,099	6,1%	2,110	6,0%
	5	48,7	2,634	5,4%	3,661	7,5%	1,090	2,2%
	6	110,6	4,008	3,6%	4,221	3,8%	3,960	3,6%
	7	134,7	7,253	5,4%	8,728	6,5%	5,904	4,4%
	8	183,7	6,161	3,4%	6,606	3,6%	5,615	3,0%
Dosaggio IgG Celiac tTG	1	15,3	1,100	7,2%	1,283	8,3%	0,929	6,1%
	2	24,3	1,727	7,1%	2,101	8,6%	1,355	5,6%
	3	29,8	1,931	6,5%	2,492	8,4%	1,289	4,3%
	4	60,5	3,046	5,0%	3,647	6,0%	2,507	4,1%
	5	99,1	4,720	4,8%	5,687	5,7%	3,756	3,8%
	6	233,7	10,022	4,3%	11,918	5,0%	7,108	3,1%
	7	263,5	13,061	5,0%	14,124	5,4%	11,794	4,4%

Limite di rilevamento

Il limite di rilevamento (LoD) è stato determinato in base a 60 replicati del bianco e 10 replicati ciascuno dei 6 campioni a basso livello (NHS). Il Lod per le IgA era di 4 UE/ml. Il Lod per le IgG era di 2,9 UE/ml.

Linearità e recupero

La linearità e il recupero sono stati testati diluendo i campioni positivi attraverso l'intervallo del dosaggio in soluzioni equidistanti e confrontando i risultati reali con quelli attesi. L'intervallo lineare del dosaggio determinato è stato di 4 (LoD), 160 UE/ml per le IgA; 2,9 (LoD), 260 UE/ml per le IgG. I risultati sono riepilogati di seguito:

Test Intervallo (UE/ml)	Pendenza (IC al 95%)	Intercetta Y (IC al 95%)	R ²	% recupero (ottenuto/atteso)
IgA				
da 6,0 a 62,7	0,932 (da 0,879 a 0,985)	0,926 (da -1,240 a 3,091)	0,9943	da 97,9 a 108,3
da 3,0 a 157,0	0,947 (da 0,892 a 1,002)	0,999 (da -4,347 a 6,345)	0,9979	da 94,5 a 107,7
da 3,3 a 163,6	0,910 (da 0,824 a 0,957)	3,239 (da -1,628 a 8,106)	0,9946	da 85,0 a 109,5
IgG				
da 3,0 a 41,9	0,987 (da 0,970 a 1,004)	0,405 (da -0,037 a 0,847)	0,9997	da 93,5 a 101,2
da 2,7 a 67,6	0,976 (da 0,839 a 1,112)	4,303 (da -0,854 a 9,459)	0,9801	da 77,6 a 100,1
da 2,9 a 260,5	0,800 (da 0,648 a 0,951)	11,6 (da -9,4 a 32,6)	0,9693	da 85,6 a 122,0

Interferenza

L'interferenza è stata studiata mescolando sieri con livelli noti di anticorpi anti-tTG con campioni di siero potenzialmente interferenti e studiando la deviazione dai risultati previsti. Non è stata dimostrata un'interferenza significativa per le seguenti sostanze ai livelli indicati: emoglobina (2 g/l), bilirubina (342 µmol/l) e fattore reumatoide (100 UE/ml).



ImmuLisa™

Celiac tTG

Recombinante Humano Anti-Transglutaminase Tecidular ELISA

IVD Para utilização diagnóstica *in vitro*

FOLHETO DO PRODUTO

REF 5144A	Celiac tTG IgA ELISA	96 Determinações
REF 5144G	Celiac tTG IgG ELISA	96 Determinações

ÂMBITO DE UTILIZAÇÃO

Teste imuno-enzimático (ELISA) para a detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos anti-transglutaminase tecidular IgA ou IgG no soro humano para ajudar no diagnóstico da enteropatia glúten-induzida / doença celíaca (DC) em conjunto com outras descobertas laboratoriais e clínicas.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A Doença Celíaca (DC) é uma patologia gastrointestinal auto-imune, relacionada com a sensibilização ao glúten em indivíduos geneticamente susceptíveis, despoletada pela ingestão de grãos que contêm glúten, como o trigo, a cevada e o centeio. Os sintomas clássicos da DC incluem a diarreia, a perda de peso e a desnutrição. Só uma pequena percentagem de pacientes com DC apresenta sintomas clássicos. Consequentemente, o quadro clínico da DC tem crescido de forma mais alargada do que no passado, incluindo os pacientes que não apresentam sintomas clássicos. Não é raro que os sintomas iniciais sejam sintomas não gastrointestinais e que os sintomas gastrointestinais, se existirem, sejam leves ou intermitentes. A necessidade de avaliar uma gama mais alargada de apresentação clínica conduziu a quantidades superiores sem precedentes de indivíduos diagnosticados com DC numa fase tardia da vida. Os adultos podem apresentar deficiência em ferro, anemia macrocítica e hipocalcemia.

Estudos demonstraram que a prevalência da DC é altamente variável. Se apenas forem utilizados critérios clínicos para determinar a prevalência, a incidência de DC é muito inferior, quando comparada com a incidência estabelecida através dos métodos serológicos.^{1,2} Utilizando métodos serológicos, estudos recentes indicam que a incidência da DC na população em geral se encontra entre um em 100 e um em 500.

A falha do diagnóstico precoce da DC pode predispor um indivíduo a complicações a longo prazo, como a atrofia esplênica e o linfoma intestinal.^{3,4} Uma dieta sem glúten (DSG) normaliza a mucosa e ajuda a reduzir o potencial maligno.

O exame histológico da biópsia do intestino delgado permanece o padrão ouro para diagnosticar a DC, mas possui as suas próprias limitações. Estas incluem alguns pacientes com DC latente ou mesmo activa, que possam ter histopatologia normal.⁵

Os critérios revistos da Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição (ESPGHAN) incluem apenas uma única biópsia com clara remissão dos sintomas clínicos sobre GFD.⁶ A sorologia positiva no momento do diagnóstico com o desaparecimento de GFD contribui para o diagnóstico. Os diversos testes sorológicos utilizados no work-up de pacientes suspeitos de padecerem de DC incluem a gliadina (AGA), o endomísio (EMA), e os testes anticorpos transglutaminase tecidular (tTG). Os anticorpos anti-gliadina e tTG são detectados pelo ELISA, enquanto os EMA são detectados através de imunofluorescência indirecta. Os EMA constituem indicadores muito específicos da DC. No entanto, o teste EMA constitui um método de imunohistoquímica que exige experiência na leitura de reacções de imunofluorescência.⁷

Desde a identificação do tTG como antígeno endomísio, os métodos ELISA têm sido utilizados para a detecção de anticorpos no soro de pacientes com DC. A vantagem do ensaio dos anticorpos anti-tTG é que este pode ser automatizado e menos subjectivo do que o EMA. Por este motivo, muitos laboratórios optaram por utilizar o método de anticorpos tTG como o método de rastreio. O ImmuLisa™ Celiac tTG é um

PT

imunoensaio único que utiliza química especial de detecção de anticorpos anti-tTG com elevado grau de especificidade e sensibilidade, minimizando a detecção não específica de anticorpos noutros controlos da doença, conforme foi relatado em alguns imunoensaios tTG.⁸⁻¹¹

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é realizado como um imunoensaio de base sólida. Os micropoços são revestidos com tecido humano recombinante transglutaminase antigénico, seguido por um passo bloqueador para reduzir a ligação não específica durante a realização do ensaio. Os controlos, os calibradores e o soro do paciente são incubados em poços revestidos com antígenios, permitindo que os anticorpos específicos presentes no soro se liguem ao antígeno tTG. Os anticorpos não ligados e as outras proteínas do soro são eliminados através da lavagem dos micropoços. Os anticorpos ligados são detectados pela adição de uma enzima conhecida como IgA anti-humana ou conjugado IgG aos micropoços. O conjugado não ligado é eliminado através de lavagem. Posteriormente, é adicionado aos poços um substrato de uma enzima específica (TMB) e a presença de anticorpos é detectada através de uma mudança de cor produzida pela conversão do substrato TMB para um produto de reacção colorido. A reacção é interrompida e a intensidade da mudança de cor, que é proporcional à concentração de anticorpos, é lida através de um espectrofotómetro a 450 nm. Os resultados são expressos em unidades ELISA por mililitro (EU/ml) e comunicados como positivos ou negativos.

REAGENTES

Armazenamento e Preparação

Armazenar todos os reagentes a 2-8°C. **Não congelar.** Os reagentes são estáveis até à data de expiração, quando são armazenados e manuseados conforme as orientações.

Não utilizar reagentes se estes não apresentarem uma cor transparente ou se houver presença de um precipitado. Todos os reagentes devem ser guardados a temperatura ambiente (20-25°C) antes da sua utilização.

Reconstituir o tampão de lavagem a 1 litro com água destilada ou desionizada. Quando armazenado a 2-8°C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade do kit.

As tiras de revestimento dos micropoços destinam-se a uma única utilização. As tiras dos micropoços não utilizadas devem ser cuidadosamente novamente selados na bolsa com dessecantes, a fim de prevenir a condensação e ser armazenadas a 2-8°C.

Precauções

Todos os componentes humanos utilizados foram testados para HBsAg, HCV, HIV-1 e 2, HTLV-I e considerados negativos segundo os testes exigidos pela FDA. No entanto, os derivados do sangue humano e as amostras de pacientes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais de armazenamento, distribuição e eliminação destes materiais.¹²

As instruções devem ser seguidas exactamente conforme constam no presente folheto deste kit, a fim de assegurar resultados válidos. Não trocar os componentes do kit por componentes provenientes de outras fontes. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais, a fim de minimizar a contaminação microbiana e cruzada dos reagentes aquando do seu manuseamento. Não utilizar os componentes do kit para além da data de validade impressa nas etiquetas.

Material fornecido

ImmuLisa™ Celiac tTG IgA ELISA

REF 5144A

ImmuLisa™ Celiac tTG IgG ELISA

REF 5144G

O kit contém reagentes suficientes para realizar 96 determinações.

12 x 8

MICROPLATE **CiTG**

Microplaca com micropoços individuais separados. Revestida com recombinante humano tTG. Pronta a utilizar.

1 x 1.75 ml

CONTROL+**CiTG-A**

Controlo Positivo (*tampa vermelha*) pronto a utilizar para **REF** 5144A. Contém soro humano positivo para anticorpos tTG IgA. A faixa de concentração esperada em EU/ml está impressa na etiqueta.

1 x 1.75 ml

CONTROL+**CiTG-G**

Controlo Positivo (*tampa vermelha*) pronto a utilizar para **REF** 5144G. Contém soro humano positivo para anticorpos tTG IgG. A faixa de concentração esperada em EU/ml está impressa na etiqueta.

1 x 1.75 ml

CONTROL-

Controlo Negativo pronto a utilizar (*tampa branca*). Contém soro humano.










PT

5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A C tG-A CALIBRATOR B C tG-A CALIBRATOR C C tG-A CALIBRATOR D C tG-A CALIBRATOR E C tG-A	Conjunto de 5 Calibradores pronto a utilizar para [REF] 5144A. Calibrador A (<i>tampa verde</i>) 160 EU/ml, Calibrador B (<i>tampa violeta</i>) 80 EU/ml, Calibrador C (<i>tampa azul</i>) 40 EU/ml, Calibrador D (<i>tampa amarela</i>) 20 EU/ml e Calibrador E (<i>tampa laranja</i>) 1 EU/ml. Derivado do soro humano contendo anticorpos tTG IgA. As concentrações em EU/ml estão impressas nas etiquetas.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A C tG-G CALIBRATOR B C tG-G CALIBRATOR C C tG-G CALIBRATOR D C tG-G CALIBRATOR E C tG-G	Conjunto de 5 Calibradores pronto a utilizar para [REF] 5144G. Calibrador A (<i>tampa verde</i>) 320 EU/ml, Calibrador B (<i>tampa violeta</i>) 80 EU/ml, Calibrador C (<i>tampa azul</i>) 40 EU/ml, Calibrador D (<i>tampa amarela</i>) 20 EU/ml e Calibrador E (<i>tampa laranja</i>) 1 EU/ml. Derivado do soro humano contendo anticorpos tTG IgG. As concentrações em EU/ml estão impressas nas etiquetas.
1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP	Conjugado HRP de cabra IgA anti-humano para [REF] 5144A. Pronto a utilizar.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Conjugado HRP de cabra IgG anti-humano para [REF] 5144G. Pronto a utilizar.
1 x 60 ml	DIL	Diluyente de Soro. Pronto a utilizar. Código de cor púrpura.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrato enzimático TMB. Pronto a utilizar. Proteger da luz.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Solução de Paragem*. Pronta a utilizar.
2 x ampolas	BUF WASH	Tampão de lavagem de pó. Reconstituir para um litro cada.
1 x		Folhas de Protocolo.

Componentes Opcionais

1 x 60ml	BUF WASH	Tampão de Lavagem Líquido concentrado. Reconstituir para um litro.
----------	----------	--

Símbolos utilizados nas etiquetas

	Número de lote
	Número de catálogo
	Utilização diagnóstica <i>in vitro</i>
	Utilização por
	Temperatura de armazenamento
	Consulte as instruções de utilização
	Número de testes
	Fabricante
	Data de fabricação



*Perigo. Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Provoca lesões oculares graves. Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. **SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS:** Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

Material Exigido Mas Não Fornecido

- Água desionizada ou destilada
- Garrafa de plástico para conter o tampão de lavagem diluído
- Pipetas com capacidade de libertação de 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis
- Tubos de ensaio limpos de 12 x 75 mm e suporte para tubo de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorventes

PT

- Leitor de microplacas capaz de ler valores de absorvância a 450 nm. Se estiver disponível um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda, o filtro de referência deve ser definido para 600-650 nm
- Lavador automático de microplacas capaz de distribuir 200 µl

RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só deverão ser utilizadas amostras de soro. As amostras excessivamente hemolizadas, lipémicas ou contaminadas microbiologicamente, podem interferir nos resultados do teste, não devendo ser utilizadas. Armazenar as amostras a uma temperatura entre 2° a 8°C durante o máximo de uma semana. Para um armazenamento de maior duração, as amostras de soro deverão ser congeladas. Evitar o repetido congelamento e derretimento das amostras. Recomenda-se que as amostras congeladas sejam testadas no prazo de um ano.

PROCEDIMENTO

Notas de Procedimento

- Ler cuidadosamente o folheto do produto antes de iniciar o ensaio.
- Todas as diluições das amostras dos pacientes devem ser preparadas antes de iniciar o ensaio.
- Permitir que as amostras dos pacientes e os reagentes de teste se equilibrem a uma temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento de teste. Sugere-se que os reagentes sejam deixados em cima da bancada, no exterior da caixa, durante 30 minutos antes da sua utilização. Voltar a colocar todas as amostras e reagentes no frigorífico imediatamente após a sua utilização.
- Eliminar as tiras necessárias dos micropoços da embalagem, voltando a fechá-la cuidadosamente, a fim de prevenir a condensação nos poços não utilizados. Voltar a colocar a embalagem de imediato no frigorífico.
- **Uma boa técnica de lavagem é fundamental.** Se a lavagem for realizada manualmente, consegue-se uma lavagem adequada direccionando o fluxo energético do tampão de lavagem por toda a microplaca, através de um frasco de lavagem de ponta larga. **Recomenda-se a utilização de uma lavadora automática de microplacas.**
- Utilizar uma pipeta multicanal capaz de libertar 8 ou 12 poços em simultâneo. Este procedimento acelera o processo, fornecendo tempos de incubação mais uniformes.
- É importante o controlo cuidadoso do tempo para todos os passos. O início de todos os períodos de incubação começa com a conclusão da adição do reagente.
- A adição de todas as amostras e reagentes deve ser realizada na mesma proporção e na mesma sequência.

Método de Teste

1º Passo Permitir que todos os reagentes e amostras se equilibrem a uma temperatura ambiente

2º Passo Etiquetar a folha de protocolo indicando a colocação da amostra nos poços. A execução das amostras em duplicado constitui uma boa prática laboratorial.

3º Passo Utilizar apenas o Calibrador D (*ampola com tampa amarela*) para obter uma **determinação qualitativa**.

ou

Utilizar os Calibradores A até E para uma **determinação semi-quantitativa**, conforme se descreve no esquema de amostras seguinte.

	Qualitativa			Semi-quantitativa			
A	Branca	S5	Etc.	A	Branca	S1	Etc.
B	-Control	S6		B	-Control	S2	
C	+ Control	S7		C	+ Control	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

PT

- 4º Passo** Preparar uma diluição **1:101** das amostras dos pacientes, misturando **5 µl** do soro do paciente com **500µl** de Diluente de Soro.
- 5º Passo** Remover os micropoços necessários da embalagem, recolocando as tiras não utilizadas na embalagem fechada, colocada no frigorífico. Colocar os micropoços com firmeza no suporte extra fornecido.
- 6º Passo** Pipetar **100 µl** de Calibradores prontos a utilizar, controlos Positivo e Negativo e amostras de pacientes diluídas (**1:101**) nos micropoços apropriados, conforme a folha de protocolo.
Nota: Incluir um poço que contenha **100 µl** do Diluente de Soro como um reagente branco. Ajustar o leitor de ELISA para zero em relação ao reagente branco.
- 7º Passo** Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a uma temperatura ambiente.
- 8º Passo** Lavar **4x** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Descartar o líquido por inversão retirando os conteúdos de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para absorver o líquido da última lavagem, inverter as tiras e limpar os poços, vigorosamente, com toalhas de papel absorvente. Para lavadores automáticos, programar o lavador conforme as instruções do fabricante.
- 9º Passo** Pipetar **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- 10º Passo** Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a uma temperatura ambiente.
- 11º Passo** Lavar todos os micropoços conforme descrito no 8º Passo.
- 12º Passo** Pipetar **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempo utilizados para o Conjugado.
- 13º Passo** Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- 14º Passo** Pipetar **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço, utilizando a mesma ordem e tempo utilizados na adição do Substrato Enzimático. Ler os valores de absorvância, no espaço de **30 minutos**, da adição da solução de paragem.
- 15º Passo** Ler a absorvância de cada micropoço a **450 nm**, utilizando um único, ou, a 450/630nm, utilizando um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda contra o reagente branco fixado em absorvância zero.

Controlo de Qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivos e Negativos e um reagente branco devem ser executados em cada ensaio, a fim de verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura de absorvância do reagente branco deve ser $<0,3$. O Calibrador A deve possuir uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário, o teste deve ser repetido. O controlo negativo deve ser <10 EU/ml. Se o teste for realizado em duplicado, deve ser retirada a média das duas leituras, a fim de determinar EU/ml. Quando se realizam determinações Qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Para as determinações semi-quantitativas, o controlo positivo deve apresentar valores na faixa indicada na ampola.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras do paciente podem ser determinadas por qualquer um dos seguintes métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

----- X EU/ml do Calibrador D = EU/ml Amostra de Teste

Abs. do Calibrador D

Recomenda-se que os resultados qualitativos sejam comunicados como “positivos” ou “negativos.” Amostras com resultados superiores ou iguais ao Calibrador D são consideradas positivas.

2. DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA

Traçar a absorvância do Calibrador A até E consoante as respectivas concentrações em papel gráfico de registo linear. Traçar as concentrações em EU/ml no eixo X, consoante a absorvância no eixo Y, e desenhar uma curva que ligue os pontos. Determinar as concentrações das amostras do paciente a partir

PT

da curva, de acordo com os valores de absorvância correspondentes. Em alternativa, pode ser utilizada uma curva de quatro parâmetros para traçar uma curva padrão.

Recomenda-se que os resultados semi-quantitativos sejam comunicados como “positivos,” “negativos,” ou “indeterminados” com valores unitários EU/ml. Os resultados indeterminados/linha divisória devem ser novamente testados e avaliados a par de outros métodos laboratoriais.

Interpretação

Os valores de interpretação foram determinados, testando 114 dadores de sangue normal e amostras sem controlo da doença celíaca. A média dos indivíduos normais mais 2 SD foi estabelecida como o corte do ensaio e foi atribuído um valor arbitrário de 20 EU/ml. A IMMCO sugere a utilização da série de referência abaixo. Cada laboratório deve validar valores de ensaio para as suas próprias condições.

Valor anti-tTG Ab	Interpretação
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminado (Linha divisória)
>25 EU/ml	Positivo

Calibrador

São incluídos Calibradores Prontos a Utilizar para providenciar uma semi-quantificação, devendo ser utilizados em cada realização. As amostras de pacientes que contenham elevados níveis de anticorpos podem apresentar valores de absorvância superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semi-quantitativos rigorosos, essas amostras devem ser ainda diluídas de modo a que recaiam no âmbito da medida da curva de calibração, quando forem novamente testadas. Para determinar valores EU/ml, multiplicar as unidades obtidas pelo factor de diluição.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Neste procedimento só deverão ser utilizadas amostras de soro. As amostras excessivamente hemolizadas, lipémicas, ou contaminadas microbiologicamente, podem interferir nos resultados do teste, não devendo ser utilizadas. Armazenar as amostras a uma temperatura entre 2 a 8°C durante o máximo de uma semana. Para um armazenamento de maior duração, as amostras de soro deverão ser congeladas. Evitar o repetido congelamento e derretimento das amostras.

Os resultados do teste servem como um apoio ao diagnóstico e devem ser considerados em conjunto com outras descobertas laboratoriais e clínicas.

VALORES ESPERADOS

Espera-se que os resultados do teste, numa população normal, sejam negativos. No entanto, como a incidência da DC na população normal é de cerca de 1%, alguns indivíduos aparentemente saudáveis e assintomáticos podem apresentar testes positivos para anticorpos tTG.

A incidência e os níveis de anticorpos anti-tTG estão dependentes do estado da dieta.. Os níveis destes anticorpos diminuem e tornar-se-ão eventualmente negativos em pacientes com DC que pratiquem uma dieta sem glúten. Da mesma forma, os níveis destes anticorpos irão aumentar e muitos tornar-se-ão positivos quando os pacientes com DC, que tenham praticado uma dieta sem glúten, façam uma dieta com glúten.¹³⁻¹⁵ Os pacientes que padecem de DC, mas que tenham falta de IgA, serão positivos em anticorpos IgG para tTG. Nesses casos, podem ser realizados testes para confirmar que o paciente tem falta de IgA.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade da Immulisa™ Celiac tTG ELISAs foi avaliada através de testes a amostras de soro EMA positivas bem caracterizadas de sujeitos suspeitos de DC, a par de controlos de doenças e de soro humano “normal”. Estas amostras foram igualmente testadas em kits de teste ELISA e de imunofluorescência comercialmente disponíveis. Estes resultados são seguidamente resumidos.

A. Immulisa™ Celiac tTG ELISAs vs. outro imunoensaio tTG:

		Outro tTG IgA ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	74	19	93
CELIAC tTG	Negativo	2	90	92
IgA ELISA	Total	76	109	185

PT

Acordo percentual positivo: 97,4% (95% CI 90,0% - 99,5%)
Acordo percentual negativo: 82,6% (95% CI 73,9% - 88,9%)
Acordo percentual global: 88,6% (95% CI 83,0% - 92,7%)

Indivíduos positivos em celiaca EMA: 93

Controlos da doença: 31

Indivíduos saudáveis normais: 61

Outro tTG IgG ELISA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	74	21	95
CELIAC tTG	Negativo	31	184	215
IgG ELISA	Total	105	205	310

Acordo percentual positivo: 70,5% (95% CI 60,7% - 78,8%)

Acordo percentual negativo: 89,8% (95% CI 84,6% - 93,4%)

Acordo percentual global: 83,2% (95% CI 78,5% - 87,1%)

Indivíduos positivos em celiaca EMA: 166

Controlos da doença: 53

Indivíduos saudáveis normais: 91

B. ImmuLISA™ Celiac tTG ELISAs vs. EMA: os resultados obtidos com o Celiac tTG ELISAs foram comparados com os resultados dos anticorpos endomísios (EMA) obtidos, utilizando um kit IFA comercialmente disponível e uma população clínica bem caracterizada.

População DC confirmada pela EMA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	87	6	93
CELIAC tTG	Negativo	1	91	92
IgA ELISA	Total	88	97	185

Acordo percentual positivo: 98,9% (95% CI 92,9% - 99,9%)

Acordo percentual negativo: 93,8% (95% CI 86,5% - 97,5%)

Acordo percentual global: 96,2% (95% CI 92,1% - 98,3%)

Indivíduos positivos em celiaca EMA: 93

Indivíduos positivos em celiaca EMA IgA: 88

Indivíduos Celíacos com Deficiência de IgA: 5

Controlos da doença: 31

Indivíduos saudáveis normais: 61

População DC confirmada pela EMA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	72	7	79
CELIAC tTG	Negativo	6	191	197
IgG ELISA	Total	78	198	276

Acordo percentual positivo: 92,3% (95% CI 83,4% - 96,8%)

Acordo percentual negativo: 96,5% (95% CI 92,6% - 98,4%)

Acordo percentual global: 95,3% (95% CI 91,9% - 97,4%)

Indivíduos positivos em celiaca EMA: 132 (74 positivos em EMA IgG)

Controlos da doença: 53

Indivíduos saudáveis normais: 91

C. Sensibilidade e Especificidade Clínicas: Foram testadas populações clínicas bem caracterizadas com DC, cujo teste Celiac tTG ELISA produziu os seguintes resultados.

Doença Celíaca

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	88	5	93
CELIAC tTG	Negativo	5	87	92
IgA ELISA	Total	93	92	185

Sensibilidade estimada: 94,6% (95% CI 87,3% - 98,0%)

Especificidade estimada: 94,6% (95% CI 87,2% - 98,0%)

Acordo: 94,6% (95% CI 90,0% - 97,2%)

PT

Indivíduos positivos em celíaca EMA IgA: 88
 Indivíduos Celíacos com Deficiência de IgA: 5
 Controlos da doença: 31
 Indivíduos saudáveis normais: 61

DC Sem Deficiência de IgA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	87	0	87
CELIAC tTG	Negativo	1	0	1
IgA ELISA	Total	88	0	88
Sensibilidade estimada:		98,9% (95% CI 92,9% - 99,9%)		
Especificidade estimada:		--		
Acordo:		98,9% (95% CI 92,9% - 99,9%)		

Indivíduos positivos em celíaca EMA IgA: 88
 Controlos da doença: 0
 Indivíduos saudáveis normais: 0

Doença Celíaca

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	72	7	79
CELIAC tTG	Negativo	60	137	197
IgG ELISA	Total	132	144	276
Sensibilidade estimada:		54,5% (95% CI 45,7% - 63,2%)		
Especificidade estimada:		95,1% (95% CI 89,9% - 97,9%)		
Acordo:		75,7% (95% CI 70,1% - 80,6%)		

Indivíduos positivos em celíaca EMA: 132 (74 positivos em EMA IgG)
 Controlos da doença: 53
 Indivíduos saudáveis normais: 91

DC Com Deficiência de IgA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	21	0	21
CELIAC tTG	Negativo	1	0	1
IgG ELISA	Total	22	0	22
Sensibilidade estimada:		95,5% (95% CI 75,1% - 99,8%)		
Especificidade estimada:		--		
Acordo:		95,5% (95% CI 75,1% - 99,8%)		

Indivíduos com Doença Celíaca com Deficiência de IgA: 22
 Controlos da doença: 0
 Indivíduos saudáveis normais: 0

D. Reactividade Cruzada: um total de 63 amostras, potencialmente com reacções cruzadas, provenientes de indivíduos com outros distúrbios de auto-anticorpos, ou positivos em relação a outros auto-anticorpos, foi testado relativamente aos anticorpos tTG, através do sistema ImmuLisa™ Celiac tTG.

Condição clínica	n	IgA Positivo n (%)	IgG Positivo n (%)
Doença de Graves	11	0 (0%)	0 (0%)
Tireoidite de Hashimoto	10	0 (0%)	0 (0%)
ANA positivo*	9	0 (0%)	1 (11%)
CCP positivo**	10	0 (0%)	0 (0%)
RF positivo***	9	0 (0%)	0 (0%)
Colite Ulcerativa	5	0 (0%)	0 (0%)
Doença de Crohn	9	0 (0%)	2 (22%)
Total	63	0 (0%)	3 (5%)

* Anticorpos Anti-Nucleares

** Anticorpos Contra Peptídeos Cíclicos Citrulinados

*** Anticorpos Factor Reumatóide

PT

Precisão

A precisão foi testada com múltiplas amostras seleccionadas ao longo de todo o intervalo de ensaio. Foram realizados três ensaios em dias diferentes, a fim de determinar resultados entre dias. Foi realizada uma experiência adicional de dez réplicas, a fim de determinar a repetibilidade. Os resultados são seguidamente resumidos.

Kit	S #	Média (EU/ml)	Imprecisão Total		Entre dias		Na experiência (Repetibilidade)	
			SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
Ensaio Celiac tTG IgA	1	10,6	1,086	10,2%	1,135	10,7%	1,095	10,2%
	2	20,4	1,224	6,0%	1,476	7,2%	0,956	4,7%
	3	25,0	1,496	6,0%	1,740	6,9%	1,271	5,1%
	4	34,9	2,075	5,9%	2,099	6,1%	2,110	6,0%
	5	48,7	2,634	5,4%	3,661	7,5%	1,090	2,2%
	6	110,6	4,008	3,6%	4,221	3,8%	3,960	3,6%
	7	134,7	7,253	5,4%	8,728	6,5%	5,904	4,4%
	8	183,7	6,161	3,4%	6,606	3,6%	5,615	3,0%
Ensaio Celiac tTG IgG	1	15,3	1,100	7,2%	1,283	8,3%	0,929	6,1%
	2	24,3	1,727	7,1%	2,101	8,6%	1,355	5,6%
	3	29,8	1,931	6,5%	2,492	8,4%	1,289	4,3%
	4	60,5	3,046	5,0%	3,647	6,0%	2,507	4,1%
	5	99,1	4,720	4,8%	5,687	5,7%	3,756	3,8%
	6	233,7	10,022	4,3%	11,918	5,0%	7,108	3,1%
	7	263,5	13,061	5,0%	14,124	5,4%	11,794	4,4%

Limite de Detecção

O limite de detecção (LoD) foi determinado com base em 60 réplicas das amostras em branco e em 10 réplicas de cada uma das 6 amostras de níveis baixos (NHS). O LoD para o IgA foi de 4,0 EU/ml. O LoD para o IgG foi de 2,9 EU/ml.

Linearidade e Recuperação

A linearidade e a recuperação foram testadas diluindo as amostras positivas, através de uma série de ensaios em diluições equidistantes e comparando os valores: actual vs esperado. A série linear dos ensaios foi determinada como 4,0 (LoD) – 160 EU/ml para o IgA e 2,9 (LoD) – 260 EU/ml para o IgG. Os resultados são seguidamente resumidos.

Série do teste (EU/ml)	Inclinação (95% CI)	Intercepção Y (95% CI)	R ²	% de recuperação (obtida/prevista)
IgA				
6,0 a 62,7	0,932 (0,879 a 0,985)	0,926 (-1,240 a 3,091)	0,9943	97,9 a 108,3
3,0 a 157,0	0,947 (0,892 a 1,002)	0,999 (-4,347 a 6,345)	0,9979	94,5 a 107,7
3,3 a 163,6	0,910 (0,824 a 0,957)	3,239 (-1,628 a 8,106)	0,9946	85,0 a 109,5
IgG				
3,0 a 41,9	0,987 (0,970 a 1,004)	0,405 (-0,037 a 0,847)	0,9997	93,5 a 101,2
2,7 a 67,6	0,976 (0,839 a 1,112)	4,303 (-0,854 a 9,459)	0,9801	77,6 a 100,1
2,9 a 260,5	0,800 (0,648 a 0,951)	11,6 (-9,4 a 32,6)	0,9693	85,6 a 122,0

Interferência

A interferência foi estudada, misturando o soro com os níveis conhecidos de anticorpos tTG com amostras de soro potencialmente interferentes, e estudando o desvio dos resultados previstos. Não foi demonstrada interferência significativa para as seguintes substâncias nos níveis indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 µmol/L), e Factor Reumatóide (100 EU/ml).

**REFERENCES/ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ/REFERENCIAS/REFERENZEN/
RÉFÉRENCES/RIFERIMENTI/REFERÊNCIAS**

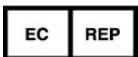
1. Guandalini S, Gupta P. Celiac disease- A diagnostic challenge. *Clin Appl Immun Rev* 2002; 2:293-305.
2. Fasano A, et al. Prevalence of celiac disease in at risk and not-at-risk groups in the United States 2003; 163:286-292.
3. Carpenter H, et al. Gastroscopy is incomplete without biopsy: Clinical relevance of distinguishing gastropathy from gastritis. *Gastroenterology* 1995; 108:917-924.
4. Catassi, et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma in celiac disease *JAMA* 2002; 287:1413-1419.
5. Kurpa K et al. Diagnosing Mild Enteropathy Celiac Disease: A Randomized, Controlled Clinical Study. *Gastroenterology* 2009; 136: 816-823.
6. Hill ID, et al. Celiac disease: Working group report of the first world congress of pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35:S78-S88.
7. Rosario D, et al. Further studies of anti-endomysium and anti-gliadin antibodies in patients with suspected celiac disease. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 27:191-195.
8. Sárdy M, et al. Tissue transglutaminase ELISA positivity in autoimmune disease independent of gluten-sensitive disease. *Clin Chim Acta.* 2007;376:126-35;
9. Song KS et al. Tissue transglutaminase autoantibodies in patients with IgM rheumatoid factors. *Yonsei Med J.* 2004;45:960-2.
10. Bizzaro N et al. Low specificity of anti-tissue transglutaminase antibodies in patients with primary biliary cirrhosis. *J Clin Lab Anal.* 2006;20:184-9.
11. Villalta D et al. False positive reactions for IgA and IgG anti-tissue transglutaminase antibodies in liver cirrhosis are common and method-dependent. *Clin Chim Acta.* 2005;356:102-09.
12. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health; 1993 (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
13. Korponay-Szabo IR, Dahlbom I, Laurila K, et al. Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. *Gut.* 2003;52:1567-1571.
14. Sulkanen S, Haltunen T, Laurila K, et al. Tissue Transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*; 1998, 115:1322-1328.
15. Dietrich W, Laag E, Schopper H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease; *Gastroenterology* 1998, 115:1317-1321.

For technical assistance please contact:



IMMCO Diagnostics, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120 USA
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands