

DIL	Diluent / Probenverdünnungspuffer / Diluyente / Diluente / Diluant /	PLATE	Solid phase / Mikrotiterplatte / Fase sólida / Fase sólida / Phase solide /
CONTROL X	Controll/Kontrolle / Control / Controlo / Contrôle /	CAL X	Calibrator / Kalibrator / Calibrador / Calibratore / Calibratore /
STOP	Stop solution / Stopplösung / Solución de parada / Soluzione di arresto / Solution d'arrêt /	SUBS TMB	Substrate/Substrat/Substrat/Sustrato/Substrat/
CONJ	Conjugate Konjugat / Conjugado / Coniugato / Conjugué /	WASH X	Washing solution / Waschlösung / Solución de lavado / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage /

IMTEC

Human
Diagnostics Worldwide

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA

Enzyme immunoassay for the determination of specific IgA antibodies against tissue transglutaminase in human serum.

For in vitro diagnostic use only.

Intended use

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA can be used for the quantitative determination of IgA specific antibodies directed against the enzyme tissue transglutaminase in the human serum.

Principle of the procedure

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA is a sandwich type enzyme immunoassay. The human recombinant tissue transglutaminase enzyme is attached to microtitration wells. Antigen-specific antibodies in the patient's serum bind to the antigens. Non-specific antibodies are removed by washing. Horse-radish peroxidase labelled goat anti-human IgA are added and bind to human antibodies in the well. The excess conjugate is washed away; then a chromogenic substrate is added. After an appropriate incubation period, the O.D. value is measured by means of an ElA reader (nm 450).

Materials provided with the kit

(quantity sufficient for 96 tests)	
Solid phase (human recombinant antigen)	12x8 wells
Enzyme-antibody conjugate (anti-human IgA, goat)	1x15 ml
Calibrators (human)	5x1,5 ml
Positive Control (human)	1x1,5 ml
Negative Control (human)	1x1,5 ml
Sample diluent	2x50 ml
Substrate	1x15 ml
Washing solution (20x)	1x50 ml
Stop solution	1x15 ml

TERGESTE:graficakasampa - COD: 32148

Composition of supplied reagents/materials

1. Solid phase

12 strips of 8 wells coated with human recombinant antigen, polyethylene vacuum-sealed bag containing a desiccant.

2. Conjugate (anti-human IgA, goat)

1 vial containing 15 ml horse-radish labelled anti-human IgA antibodies (goat) in a buffer solution with Proclin 300 as a preservative.

3. Calibrator

5 vials containing 1,5 ml positive serum (human) in a buffer solution with Proclin 300 as a preservative. Calibrators values are reported in Units (U/ml) and printed on the vial label. Calibrators are ready to use.

4. Positive control

1 vial containing 1,5 ml positive control serum (human) in a buffer solution with Proclin 300 as a preservative. Ready to use.

5. Negative control

1 vial containing 1,5 ml negative control serum (human) in a buffer solution with Proclin 300 as a preservative. Ready to use.

6. Sample diluent

2 vials containing 50 ml buffer solution with Proclin 300 as a preservative.

7. Substrate (TMB)

One vial containing 15 ml chromogenic buffer solution.

8. Washing solution

1 vial containing 50 ml concentrate solution (20x) with detergents and Proclin 300 as a preservative.

9. Stop solution

One vial containing 15 ml H2SO4 0,5M.

Materials required but not provided

1. ElA reader (450 nm)
2. Precision pipettes (5, 10 and 1000 µl)
3. Distilled water

Performance criteria and limits of the procedure

The test allows the detection of anti-tissue transglutaminase antibodies in human serum thus enabling to distinguish between coeliac patients and healthy subjects. The dynamic range of the system range between 0 and 100 Units (U/ml).

1. Intra-assay variation

5 reference sera were tested 6 times in the same run. The results are reported below:

Serum	1	2	3	4	5
Mean (U/ml)	13.81	24.20	10.78	3.83	5.93
S.D.	1.307	1.283	1.338	0.210	0.561
CV%	9.5	5.3	12.4	5.5	9.5

2. Inter-assay variation

5 reference sera were tested 3 times in 3 different runs. The results are reported below:

Serum	1	2	3	4	5
Mean (U/ml)	25.33	11.40	19.03	3.97	5.97
S.D.	1.155	0.557	1.137	0.306	0.252
CV%	4.6	4.9	6.0	7.7	4.2

3. Inter-lot-to-lot variation

5 reference sera were tested in duplicate using 3 different batches. The results are reported below:

Serum	1	2	3	4	5
Mean (U/ml)	2.45	4.45	15.05	26.07	68.48
S.D.	0.132	0.250	0.150	1.304	1.973
CV%	5.4	5.6	1.0	5.0	2.9

4. Diagnostic sensitivity

Sera from 130 clinically diagnosed adult coeliac patients were tested. The found value was 99,2%.

5. Diagnostic specificity

Sera from 150 healthy subjects were tested. The found value was 98,7%.

6. Sample diluent

2 vials containing 50 ml buffer solution with Proclin 300 as a preservative.

7. Substrate (TMB)

One vial containing 15 ml chromogenic buffer solution.

8. Washing solution

1 vial containing 50 ml concentrate solution (20x) with detergents and Proclin 300 as a preservative.

9. Stop solution

An accelerate stability test proved that all reagents are stable after 96 hours at 37°C.

Stability during transportation

An accelerate stability test proved that all reagents are stable after 96 hours at 37°C.

Preparation of reagents

Washing solution

Prepare the washing solution by diluting the content of the whole vial with

distilled or deionised water to a final volume of 1000 ml.

Sample collection

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA requires serum. It is important to preserve the integrity of the blood sample from its collection till the end of the test. Perform phlebotomy using a non-traumatic venupuncture technique. Allow blood to clot for at least 20-30 minutes, until the clot starts to retract. Before centrifugation, remove the clot from the collection tube walls. It is not necessary to add preservatives to the serum to keep integrity of the serum sample. Samples should be stored at 2-8°C and assayed within 24 hours after collection. If the test cannot be run within 24 hours, serum sample should be frozen (aliquots). Avoid repeated freezing and thawing of serum. Do not use automatic-defrost-freezers, as samples might undergo to repeated freezing and thawing cycles which might denature class IgA antibodies and lead to wrong results. Avoid use of lipemic, hemolyzed or contaminated serum samples.

Sample dilution

Sample must be diluted 1:101 (10 µl serum in 1,0 ml sample diluent) before use. Diluted samples can be stored for 24 hours at 4°C or for a week at -20°C.

Procedure

Allow all the reagents to reach room temperature. Define the appropriate amount of patients sera needed to complete the test. Prepare the samples by diluting each serum 1:101 (10 µl serum in 1,0 ml sample diluent) and mix well. The calibrator and the controls provided with the kit are ready to use, are not to be diluted and must be included in each test run. Place the required number of strips into the plate-holder and make sure they are well fixed.

1. Pipette 100 µl of each calibrator in the first wells (A1-B1, ... A2-B2).
2. Pipette 100 µl of negative control, 100 µl of positive control and 100 µl of diluted samples (1:101) in the remaining wells.

3. Cover the wells in order to prevent evaporation and incubate for 45 minutes at room temperature (RT).
4. After incubation remove the liquid completely.

5. Pipette 300 µl/well of washing solution and then remove the liquid from the wells.
6. Repeat this step 3 times.

7. Pipette 100 µl anti-IgA conjugate in each well.
8. Cover the wells in order to prevent evaporation and incubate for 30 minutes at RT.

9. Repeat washing steps as above.
10. Pipette 100 µl substrate in each well.

11. Cover the wells in order to prevent evaporation and incubate for 15 minutes at RT.
12. Stop the reaction by adding 100 µl Stop Solution.

13. Read the results by means of an ElA reader at 450 nm.

Calculation of results

Analyse results by means of a point-to-point linear regression. In case of

manual calculation, define the average O.D. value for both Calibrator and samples tested in duplicate. Plot the average OD values of calibrators on the Y axis and the concentration of calibrators on x-axis on a lin-lin graph paper. The obtained calibration curve will be used to calculate the U/ml values of each sample

Quality control

The OD value of the Calibrator S5 must be higher than 1,3. It is possible to check the development of the reaction by reading the absorbance values with a filter at 620 nm. After addition of the stop solution, OD values around 0,6 correspond to approx. 1,8 - 2,0 OD at 450 nm. The concentration of the Calibrators is printed on the vial label. The ranges of the Positive and Negative Controls are printed on the vial label. In case of values falling outside the assigned range, the test must be repeated. If one of the situation listed above is still present after the new run, please contact the local distributor and/or the manufacturer. The certificate of analysis of the product is available at the manufacturer and can be provided upon request.

unit. It is very important not to interchange reagents from different lots.

5. Use new pipette tips for each sample, control and reagent in order to avoid cross-contamination

6. TMB-substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to air.

7. If the outer package is damaged, please check carefully that all items listed in the section "Supplied materials" are present and unbroken. Check specifically that vacuum is still present in the polyethylene bag containing the microtitre wells. In case of either liquid leakage from vials or lack of vacuum in the bag, the kit cannot be used.

8. Dispose of materials containing human serum or previously in contact with and residual reagents as dangerous special waste. Dispose according to local laws.

Bibliography

1. Dieterich W. Et al. "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease" Nat Med 1997; 3: 797-801
2. Sardy M et al. "Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy" Clin Chem 1999 Dec; 45(12): 2142-2149
3. Slatter D. et al. "Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease" Am J Gastr 2000 May; 95(5): 1253-1257
4. Trevisol C. "A riable screening procedure for coeliac disease in clinical practice" Scad J Gastr 2002 Jun; 37(6): 679-684.

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA



IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA

Dosage immunoenzymatique pour la détection des anticorps IgA spécifiques à la transglutaminase tissulaire dans le sérum humain.

Pour usage diagnostique *in vitro* seulement

Utilisation
IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA est utilisé pour la détermination quantitative dans le sérum humain des anticorps IgA dirigés spécifiquement contre la transglutaminase tissulaire.

Principe du test

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA est un dosage immunoenzymatique de type sandwich. La transglutaminase tissulaire recombinante humaine est coâtée sur les puits de la microplaqué. Les anticorps spécifiques présents dans le sérum du patient se lient spécifiquement aux antigènes. Les anticorps non spécifiques sont éliminés lors d'un lavage. Le conjugué de chèvre anti-IgA humaine marqué à la peroxydase du raiport se lie aux complexes antigène-anticorps formés. Le conjugué en excès est éliminé lors d'une phase de lavage après incubation. Le substrat est ajouté. Après une incubation appropriée, la solution d'arrêt est rajoutée puis la densité optique de chaque puits est lue à l'aide d'un lecteur de plaque à 450 nm.

Introduction

L'antigène transglutaminase découvert par Dietrich et al en 1997 est l'autoantigène endomysial de la maladie coeliaque. La recherche des anticorps anti-transglutaminase IgA constitue un nouveau test complémentaire aux anticorps anti-gliadine et aux anticorps antiendomysium pour une optimisation de l'aide au diagnostic de la maladie coeliaque et de son suivi.

Composition du coffret

(quantité suffisante pour 96 tests)	
Phase solide (antigène humain recombinant)	12x8 puits
Conjugé (anti-IgA humaine, chèvre)	1x15 ml
Calibrateurs (humain)	5x1,5 ml
Contrôle positif (humain)	1x1,5 ml
Contrôle négatif (humain)	1x1,5 ml
Diluant d'échantillon	2x50 ml
Substrat	1x15 ml
Solution de lavage (20x)	1x50 ml
Solution d'arrêt	1x15 ml

Matériel fourni

1. Phase solide	
12 barrettes de 8 puits contenant un antigène humain recombinant, scellées	

sous vide et emballés dans un sachet de polyéthylène avec un agent de dessiccation.

2. Conjugué (anti-IgA humaine, chèvre)

1 flacon de 15 ml d'anticorps de chèvre anti-IgA humaine, marqués à la peroxydase du raiport, dans une solution tamponnée avec du Proclin 300 comme conservateur.

3. Calibrateurs

5 flacons contenant 1,5 ml de sérum positif (humain) dans une solution tamponnée avec du Proclin 300 comme conservateur. Les valeurs des calibrateurs en U/ml sont inscrites sur les étiquettes. Les calibrateurs sont prêts à l'emploi.

4. Contrôle positif

1 flacon contenant 1,5 ml de sérum positif (humain) en solution tamponnée avec du Proclin 300 comme conservateur. Prêt à l'emploi.

5. Contrôle négatif

1 flacon contenant 1,5 ml de sérum négatif (humain) en solution tamponnée avec du Proclin 300 comme conservateur et prêt à l'emploi.

6. Diluant d'échantillon

2 flacons contenant 50 ml de solution tamponnée avec du Proclin 300 comme conservateur.

7. Substrat (TMB)

1 flacon de 15 ml de substrat chromogénique.

8. Solution de lavage

1 flacon de 50 ml de solution concentrée (20x) avec du détergent et du Proclin 300 comme conservateur.

9. Solution d'arrêt

1 flacon de 15 ml de solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) 0,5M.

Matériel nécessaire non fourni

1. Lecteur de microplaqué (filtre à 450 nm).
2. Micropipettes de 5, 10 et 1000 µl.
3. Eau distillée.

Critères de performance et limites de la méthode

La méthode permet le dosage des anticorps anti-transglutaminase tissulaire pour différencier la population de malades coeliaques de la population saine. La gamme de titrage va de 0 à 100 unités (U/ml).

1. Variations intra-essai

Pour 5 sérum différents testés 6 fois chacun en une seule série, les résultats sont les suivants:

Sérum	1	2	3	4	5
Moyenne (U/ml)	13.81	24.20	10.78	3.83	5.93
D.S.	1.307	1.283	1.338	0.210	0.561
CV%	9.5	5.3	12.4	5.5	9.5

Matériel fourni

1. Phase solide

12 barrettes de 8 puits contenant un antigène humain recombinant, scellées

2. Variations inter-essai

Pour 5 sérum différents testés lors de 3 séries différentes, les résultats sont les suivants:

Sérum	1	2	3	4	5
Moyenne (U/ml)	25.33	11.40	19.03	3.97	5.97
D.S.	1.155	0.557	1.137	0.306	0.252
CV%	4.6	4.9	6.0	7.7	4.2

3. Variations Inter-lot

Pour 5 sérum différents testés en double avec 3 lots différents, les résultats sont les suivants:

Sérum	1	2	3	4	5
Moyenne (U/ml)	2.45	4.45	15.05	26.07	68.48
D.S.	0.132	0.250	0.150	1.304	1.973
CV%	5.4	5.6	1.0	5.0	2.9

4. Sensibilité

La sensibilité du test sur un panel de sérum de 130 malades coeliaques confirmés est de 99,2%.

5. Spécificité

La spécificité du test sur un panel de sérum de 150 sujets sains est de 98,7%.

6. Conservation

Tous les réactifs doivent être conservés à 2-8°C et utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Eviter l'exposition à des températures élevées, à la lumière directe du soleil ou à une forte humidité.

Stabilité après ouverture

Tous les composants du coffret sont stables pendant 60 jours après ouverture si'ils sont conservés dans leur emballage ou flacon d'origine et à 2-8°C.

Stabilité pendant le transport

Un test de stabilité accélérée a prouvé que tous les réactifs sont stables après 96 heures à 37°C.

Préparation des réactifs

Solution de lavage

Préparer la solution de lavage en diluant le contenu du flacon avec de l'eau distillée ou deionisée pour un volume final de 1000 ml.

Prélèvement d'échantillons

Le coffret IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA nécessite l'utilisation de sérum. Il est important de conserver l'intégrité de l'échantillon de sang du prélèvement au moment de l'analyse. Effectuer un prélèvement en utilisant une technique non traumatique. Laisser coaguler le sang pendant 20 à 30 minutes de façon à faciliter le retrait du caillot. Avant centrifugation, éliminer le caillot. Il n'est pas nécessaire d'ajouter du conservateur pour maintenir l'intégrité du sérum. Les échantillons doivent être conservés à 2-8°C et analysés au plus tard après 24 heures. Si les analyses ne peuvent pas être effectuées dans les 24 heures, congeler l'échantillon de sérum. Éviter de congeler et décongeler de

façon répétée. Ne pas utiliser de congélateurs à dégivrage automatique afin d'éviter les congélations et décongélations répétées qui peuvent dénaturer les anticorps de classe IgA et conduire à de faux résultats. Eviter l'utilisation d'échantillons de sérum lipidiques, hémolysés ou contaminés.

Dilution d'échantillon

Diluer l'échantillon au 1:101 (10 µl de sérum dans 1,0 ml de diluant d'échantillon). La dilution ainsi obtenue peut être conservée pendant 24 heures à 4°C ou pendant une semaine à -20°C.

Procédure

Attendez que tous les réactifs soient à température ambiante avant de commencer le test. Définir le nombre de sérum à tester dans la série. Préparez les échantillons en diluant chacun des sérum à 1:101 et bien mélanger. **Les calibrateurs et les contrôles sont prêts à l'emploi. Ils ne doivent pas être dilués et doivent être inclus dans chaque série.**

Vérifiez que tous les puits sont correctement insérés sur le support de plaque. Disposer les barrettes nécessaires sur le support de plaque.

1. Déposer 100 µl de chaque calibrateur en double dans les puits A1-B1...A2-B2.

2. Déposer 100 µl de contrôle positif, 100 µl de contrôle négatif et 100 µl d'échantillons dilués (1:101) dans les autres puits.

3. Incuber pendant 45 minutes à température ambiante en recouvrant les puits pour éviter toute évaporation.

4. À la fin de l'incubation renverser la plaque et éliminer d'un coup sec tout le liquide résiduel.

5. Effectuer un premier lavage en distribuant 300 µl de solution de lavage dans les puits puis renverser la plaque pour éliminer complètement la solution de lavage.

6. Répéter trois fois l'étape 5.

7. Déposer 100 µl de conjugué anti-IgA dans chaque puits.

8. Recouvrir la plaque afin d'éviter l'évaporation et incuber à température ambiante pendant 30 minutes.

9. Répéter trois fois l'étape 5.

10. Déposer 100 µl de substrat dans chaque puits.

11. Recouvrir la plaque afin d'éviter l'évaporation et incuber à température ambiante pendant 15 minutes.

12. Distribuer 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits.

13. Lire les résultats à l'aide d'un lecteur colorimétrique à 450 nm.

Calcul des données

Les résultats sont obtenus à partir de la courbe de régression linéaire de point à point. Pour le calcul manuel, déterminer la moyenne des duplicates des calibrateurs et échantillons. Reporter les DO moyennes des calibrateurs sur l'axe Y correspondant à leurs concentrations (axes X) sur une feuille de papier millimétré. Construire la courbe de calibration permettant d'obtenir les concentrations en U/ml des échantillons testés.

Contrôle de Qualité

La DO du Calibrateur S5 doit être supérieure à 1,3. Il est possible de contrôler

le développement de la DO des calibrateurs à 620 nm. Une DO de 0,6 à 620 nm correspond à une DO de 1,8-2,0 à 450 nm après rajout de la solution d'arrêt. Les concentrations des calibrateurs sont imprimer sur le flacon. La gamme des valeurs du contrôle négatif et du contrôle positif est imprimer sur le flacon. Si les valeurs obtenues sortent de la gamme recommandée, le test doit être répété. En cas de problèmes répétés, contacter le distributeur ou le producteur. Certificat d'analyse disponible sur demande.

Valeurs normales

La bonne pratique de laboratoire conseille que chaque laboratoire calcule sa valeur de seuil à partir d'un nombre d'échantillons significatifs avant de donner une valeur clinique à ce test. Une étude a permis d'obtenir les valeurs suivantes:

Titre en IgA

Négatif: < 9,0 U/ml

</div