DIL	Diluent / Probenverdünnungspuffer / Diluyente / Diluente / Diluant /	PLATE	Solid phase / Mikrotiterplatte / Fase sólida / Fase solida / Phase solide /
CONTROL X	Controll / Kontrolle / Control / Controllo / Contrôle /	CAL X	Calibrator / Kalibrator / Calibrador / Calibratore / Calibrateur /
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 IgG

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

For in vitro diagnostic use only.

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

Principle of the procedure
IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG 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 IgG 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 a EIA 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 IgG, 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

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 IgG, goat)
1 vial containing 15 ml horse-radish labelled anti-human IgG 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. EIA 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)	12.60	42.98	8.32	12.01	11.0
S.D.	1.571	4.414	0.409	0.800	0.778
CV%	12.5	10.3	4.9	6.7	7.1

2. Inter-assay variation
5 reference sera were tested in duplicate 3 times in 3 different runs. The results are reported below:

Serum	1	2	3	4	5
Mean (U/ml)	13.73	46.23	8.93	13.47	11.73
S.D.	1.097	2.909	0.808	0.902	0.153
CV%	8.0	6.3	9.0	6.7	1.3

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)	10.32	17.60	14.57	19.27	42.25
S.D.	0.681	0.265	1.549	0.778	0.876
CV%	6.6	1.5	10.6	4.0	2.1

4. Diagnostic sensitivity
Sera from 179 clinically diagnosed adult coeliac patients were tested. The found value was 58,7%.

5. Diagnostic specificity
Sera from 276 healthy subjects were tested. The found value was 94,6%.

Storage
All reagents must be stored at 2-8°C and used before the expiration date printed on the vial label. Avoid exposure to high temperature, direct sunlight or extreme humidity conditions.

Stability after first use
All the components of the kit are stable for 60 days in their original container if stored at 2 - 8°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 IgG 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 denaturate class IgG antibodies and lead to wrong results. Avoid use of lipemic, hemolized 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-IgG 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 EIA 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.

Reference limits
Good laboratory practice indicates that each laboratory should establish its own range of normal values using a statistically significant number of samples before assigning a clinical value to this test. Further, internal controls should also be tested to verify components and test procedure performance. Therefore, each laboratory should establish its own cut-off value. An internal study gave the following cut-off:

Negative values < 20,0 AU/ml
Positive values ≥ 20,0 AU/ml

Interpretation of the results
In order to achieve a proper serologic diagnosis by means of the combined use of IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA and IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG, it is advisable to refer to the following table.

Patients without Total serum IgA deficiency	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Positive ≥ 16	Positive ≥ 20
Positive serology for coeliac disease.	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Borderline 9 ÷ 16	Positive ≥ 20
Positive serology for coeliac disease. HLA DQ2/D08 typing is recommended.	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Negative < 9	Negative < 20
Negative serology for coeliac disease	

Patients with Total serum IgA deficiency	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Negative < 9	Negative < 20
Negative serology for coeliac disease	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Negative < 9	Positive ≥ 20
Positive serology for coeliac disease. HLA DQ2/D08 typing and Total serum IgA test are recommended.	

Limitation of the procedure
1. The results obtained by this test must be used as diagnostic support only.
2. Reproducibility of results depends upon an accurate pipetting technique, proper application of incubation times and temperatures, accurate washing steps and reagents preparation.

Precautions
1. Allow the reagents to reach room temperature (15-25°C) before starting the test.
2. Concentration of Proclin used as preservative in the reagent solutions is lower than 0.1% (w/w).
3. All sera used in this kit were found to be not reactive for Hepatitis B surface antigen (HBsAg), for anti-HCV and anti- HIV I and II. However, this material should be handled as potentially infectious.
4. Note: All kit components have been tested and standardised as a single 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 inhalated, take the person at open 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 specially 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 it and residual reagents as dangerous special waste. Dispose of according to local laws.

Bibliography

1. Dieterich W. et al. "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease." Nat Med. 1997 Jul;3(7):797-801.
2. Sblattero D. et al. "Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease." Am J Gastroenterol 2000 May;95(5):1253-7.
3. Cataldo F. et al. "IgG(1) antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patientswith selective IgA deficiency". Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue." Gut. 2000 Sep;47(3):366-9.
4. Picarelli A. et al. "Identification of a new coeliac disease subgroup: antiendomysial and anti-transglutaminase antibodies of IgG class in the absence of selective IgA deficiency." J Intern Med. 2001 Feb;249(2):181-8.
5. Baldas V. et al. "Development of a novel rapid noninvasive screening test for coeliac disease." Gut. 2000 Nov;47(5):628-31.

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG CE

REF: ITC30305

96 tests

Revision date: 2010.05.28

Distributed by: Human

Eurospital SpA
34147 Trieste, via Flavia 122
Tel. +39 040 8997.1 - Fax +39 040 280944
www.eurospital.com - info@eurospital.com

TERGESTE grafica&stampa - COD. 32149

IMTEC Human Diagnostics Worldwide

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG

Enzym-Immunoassay zur Bestimmung von spezifischen IgG-Antikörpern gegen Gewebstransglutaminase im Serum.

Nur zur in-vitro- Diagnostik

Verwendungszweck
Der IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG Kit wird zur quantitativen Bestimmung spezifischer IgG-Antikörper gegen Gewebstransglutaminase in Humanserum eingesetzt.

Testprinzip
Der IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG Testkit ist ein Sandwich-Enzym-Immunoassay. Die Oberfläche der Mikrotiter-Platten ist mit humaner rekombinanter Gewebstransglutaminase beschichtet. Die antigenspezifischen Antikörper im Patientenserum binden an das Antigen, und die unspezifischen Antikörper werden durch einen Waschschritt entfernt. Daraufhin wird ein mit Meerrettichperoxidase markierter anti human-IgG-Antikörper zugegeben, der die Antikörper innerhalb der Mikrotiter-Platte bindet.Das überschüssige Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird das Substrat zugegeben. Nach einer Inkubationszeit wird die optische Dichte (O.D.) der Lösung mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

Packungsinhalt
(Ausreichend für 96 Tests)
Mikrotiter-Platten (mit humaner rekombinanter

Gewebstransglutaminase als Beschichtungsantigen)	12x8 Streifen
Enzym-Antikörper-Konjugat (anti-human IgG, Ziege)	1x15 ml
Kalibratoren (human)	5x1,5 ml
Positivkontrolle (human)	1x1,5 ml
Negativkontrolle (human)	1x1,5 ml
Probenverdünnungspuffer	2x50 ml
Substrat	1x15 ml
Waschlösung (20x)	1x50 ml
Stopplösung	1x15 ml

Zusammensetzung der Reagenzien
1. Mikrotiterplatte
12 Streifen à 8 Mikrotiter-Küvetten, beschichtet mit humanem rekombinantem Antigen, verpackt in einem unter Vakuum verschlossen Polyethylenbeutel mit Trocknungsmittel.

2. Enzym-Antikörper-Konjugat (anti-human IgG, Ziege)
1 Flasche mit 15 ml des anti-human-IgG-Antikörpers (Ziege) markiert mit Meerrettichperoxydase in Pufferlösung, unter Zusatz von Proclin 300 als Konservierungsmittel.

3. Kalibratoren
5 Flaschen mit 1,5 ml des gebrauchsfertigen Positiv-serums (human) in Pufferlösung mit Zusatz von Proclin 300 als Konservierungsmittel. Der Wert des Referenzserums ist auf dem Etikett angegeben.

4. Positivkontrolle
1 Flasche mit 1,5 ml des gebrauchsfertigen Positiv-Kontrollserums (human) in Pufferlösung mit Zusatz von Proclin 300 als Konservierungsmittel.

5. Negativkontrolle
1 Flasche mit 1,5 ml des gebrauchsfertigen Negativ-Kontrollserums (human) in Pufferlösung mit Zusatz von Proclin 300 als Konservierungsmittel.

6. Probenverdünnungslösung
2 Flaschen mit 50 ml Pufferlösung mit Zusatz von Proclin 300 als Konservierungsmittel.

7. Substratlösung (TMB)
1 Flasche mit 15 ml TMB-Substratlösung .

8. Waschlösung
1 Flasche mit 50 ml Waschlösungskonzentrat (20X) mit Detergenzien und mit Zusatz von Proclin 300 als Konservierungsmittel.

9. Stopplösung
1 Flasche mit 150 ml 0,5 M H2SO4.

Zusätzlich benötigtes Material
1. Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
2. Messpipetten zu 5, 10, 1000 µl
3. Destilliertes Wasser

Leistungsdaten und Grenzen des Verfahrens
Der Test ermöglicht die Bestimmung von Antikörpern gegen die Gewebstransglutaminase im humanen Serum zur Unterscheidung zwischen Patienten mit Zöliakie und gesunden Personen. Der dynamische Bereich liegt bei diesem Test zwischen 0 und 20 arbiträren Einheiten (AU).

1. Abweichung zwischen den einzelnen Proben (Intra-Assay-Abweichung)
5 Referenzseren wurden in einem Testansatz jeweils 6-mal getestet. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt:

Probe	1	2	3	4	5
Mittelwert(AU/ml)	12.60	42.98	8.32	12.01	11.0
{s}	1.571	4.414	0.409	0.800	0.778
VK%	12.5	10.3	4.9	6.7	7.1

2. Abweichung zwischen den einzelnen Testansätzen (Inter-Assay-Abweichung)
5 Referenzseren wurden an 3 verschiedenen Testansätzen im Doppelansatzung in 3 verschiedenen Chargen getestet. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt:

Probe	1	2	3	4	5
Mittelwert(AU/ml)	13.73	46.23	8.93	13.47	11.73
{s}	1.097	2.909	0.808	0.902	0.153
VK%	8.0	6.3	9.0	6.7	1.3

3. Lot zu Lot Varianz
5 Referenzseren wurden an 3 verschiedenen Tagen im Doppelansatz unter Einsatz von drei verschiedenen Chargen getestet. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt:

Probe	1	2	3	4	5
Mittelwert(E/ml)	10.32	17.60	14.57	19.27	42.25
{s}	0.681	0.265	1.549	0.778	0.876
VK%	6.6	1.5	10.6	4.0	2.1

4. Diagnostische Sensitivität
Seren von 179 klinisch diagnostizierten Zöliakie-Erwachsenen-Patienten wurden getestet. Der ermittelte Wert betrug 58,7%.

5. Diagnostische Spezifität
Seren von 276 gesunden Probanden wurden getestet. Der ermittelte Wert betrug 94,6%.

Lagerung der Reagenzien
Alle Reagenzien müssen im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert werden und vor Ablauf des Verfallsdatums, das auf den Flaschenetiketten aufgedruckt ist, aufgebraucht werden. Setzen Sie die Reagenzien nicht hohen Temperaturen, direktem Sonnenlicht oder extremer Feuchtigkeit aus.

Haltbarkeit nach Anbruch der Packung
Alle Kitkomponenten sind nach Anbruch bei Aufbewahrung in der Originalverpackung und Lagerung bei 2-8°C 60 Tage haltbar.

Haltbarkeit während des Transports
Ein Stabilitätstest hat bewiesen, dass alle Reagenzien nach 96 Stunden Lagerung bei 37°C stabil waren.

Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung
Gesamtes Wäschlösungskonzentrat mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf 1000 ml auffüllen.

Probensammlung
Zur Durchführung des IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG Tests wird Serum benötigt. Es ist wichtig, darauf zu achten, dass sich die Eigenschaften des Probenmaterials vom Augenblick der Blutentnahme bis hin zur Testdurchführung nicht verändern. Hämolytisches Serum sollte nicht verwendet werden. Es ist nicht notwendig, das Serum mit Konservierungsmitteln zu versetzen. Die Serumproben sollten bei 2-8°C aufbewahrt und innerhalb von 24 Stunden gemessen werden. Wenn der Test nicht innerhalb von 24 Stunden durchgeführt werden kann, sollten die Proben eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen des Serums vermeiden. Benutzen Sie keine Gefrierschränke mit Abtau-Automatik, da die Proben auf diese Weise wiederholt auftauen und tiefffrieren können. Dies kann zu einer Denaturierung der IgG-Antikörper und damit verbunden zu falschen Ergebnissen führen. Vermeiden Sie den Einsatz von lipämischen, hämolytischen oder kontaminierten Serumproben.

Probenverdünnung
Die Patientenseren müssen vor der Weiterverarbeitung 1:101 mit Probenverdünnungslösung verdünnt werden (10 µl Serum in 1,0 ml Probenverdünnungslösung). Die verdünnten Seren können bei 4°C 24 Stunden und bei -20°C eine Woche lang aufbewahrt werden.

Testdurchführung
Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Die genaue Anzahl von Patientenseren für diesen Test festlegen. Patientenseren 1:101 verdünnen (10 µl Serum in 1,0 ml Probenverdünnung. Gut mischen. Der im Kit enthaltene Kalibrator sowie die Kontrollen sind gebrauchsfertig und werden unverdünnt eingesetzt. Sie müssen in jeden Testlauf einbezogen werden. Die erforderliche Anzahl an Mikrotiter-Streifen in die Mikrotiterplatten eindrücken und schütteln, um nachzuprüfen, ob alle Mikrotiter-Streifen richtig eingeklemmt sind und nicht herausrutschen.
1. 100 µl Kalibratoren in Doppelbestimmung in Position A1-B1. . . .A2-B2 pipettieren.
2. 100 µl Positivkontrolle und 100 µl Negativkontrolle pipettieren und danach jeweils 100 µl vorverdünnte (1:101) Patientenprobe in die restlichen Mikrotiter-Küvetten pipettieren.
3. Mikrotiter-Küvetten abdecken (Verdunstungsschutz) und bei Raumtemperatur 45 Minuten inkubieren.
4. Mikrotiter-Küvetten umdrehen und gut ausklopfen, um sämtliche Flüssigkeitsreste zu entfernen.
5. Mikrotiter-Küvetten mit jeweils 300 µl Waschlösung 3-mal waschen und gut ausklopfen.
6. 100 µl anti-IgG-Konjugat in alle Mikrotiter-Küvetten pipettieren.
7. Mikrotiter-Küvetten abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
8. Waschschritte (s.o.) Wiederholen.
9. 100 µl Substrat in alle Mikrotiter-Küvetten pipettieren.
10. Mikrotiter-Küvetten abdecken und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubieren.
11. Stoppen der Reaktion mit 100 µl Stopplösung.
12. Messung der optischen Dichte (O.D.) bei 450 nm.

Berechnung der Ergebnisse
Für die Auswertung der Resultate verwenden Sie eine Punkt zu Punkt Kurve. Bei manueller Auswertung berechnen Sie den Mittelwert der OD des Kalibrators und der Proben. Tragen Sie den Mittelwert der OD auf die y-Achse und die Konzentration des Kalibrators auf die x-Achse in einem Millimeterpapier ein. Anhand der erhaltenen Kalibrationskurve können Sie die Probenkonzentration in U/ml ablesen.

Qualitätskontrolle
Der OD-Wert des Kalibrators S5 muß höher sein als 1,3. Es ist möglich die Entwicklung der Reaktion bei 620 nm zu messen. Nach Zugabe der Stopplösung entsprechen OD-Werte um 0,6 einer OD von 1,8 - 2,0 bei 450 nm. Die Konzentration des Kalibrators ist auf dem Flaschenetikett aufgedruckt. Der pos bzw. neg. Wert der Kontrollen ist ebenfalls auf dem Flaschenetikett aufgedruckt. Sollten die pos bzw. neg. Vertrauensbereiche nicht erreicht werden, muß der Test wiederholt werden. Falls einer der oben genannten Fehler auch bei einem wiederholten Testlauf auftritt, informieren Sie bitte den Lieferanten und/ oder den Hersteller des Tests. Das Analysen-Zertifikat zum vorliegenden Produkt ist beim Hersteller des Tests erhältlich und wird auf Wunsch zur Verfügung gestellt.

Normalwerte
Jedes Labor sollte sich gemäß den GLP Richtlinien seinen eigenen Normalbereich erstellen, basierend auf einer statistisch signifikanten Probenanzahl. Außerdem sollten interne Kontrollen bei jeder Testdurchführung mitgeführt werden, um die Qualität aller Materialien und der Testdurchführung zu belegen. Deshalb sollte jedes Labor auch seinen eigenen Cut-off-Wert festlegen. In einer internen Studie wurden folgende Cut-off-Werte ermittelt:

Negativ < 20,0 AU/ml
Positiv ≥ 20,0 AU/ml

Interpretation der Ergebnisse
Für eine einwandfreie serologische Diagnose empfehlen wir den kombinierten Einsatz des IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA und des IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG.

Patienten ohne mögliche Gesamt-Serum IgA Defizienz	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Positiv ≥ 16	Positiv ≥ 20
Positive Serologie für Zöliakie.	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Borderline 9 ÷ 16	Positiv ≥ 20
Positive Serologie für Zöliakie. HLA DQ2/DQ8 Typisierung wird empfohlen	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Negativ < 9	Negativ < 20
Negative Serologie für Zöliakie	

Patienten mit möglicher Gesamt-Serum IgA Defizienz	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Negativ < 9	Negativ < 20
Negative Serologie für Zöliakie	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Negativ < 9	Positiv ≥ 20
Positive Serologie für Zöliakie. HLA DQ2/DQ8 Typisierung und Test des Gesamt-IgA im Serum wird empfohlen.	

Beschränkungen des Tests
1. Die mit diesem Test erzielten Ergebnisse dienen ausschließlich diagnostischen Zwecken.
2. Die Reproduzierbarkeit des Tests hängt ab von der präzisen Pipettiertechnik, der genauen Einhaltung der Inkubationszeiten, -temperaturen und der Waschschritte sowie der Reagenzienvorbereitung.

Warnhinweise
1. Alle Reagenzien vor Entnahme auf Raumtemperatur (15-25°C) bringen.
2. Die Konzentration des als Konservierungsmittel verwendeten Proclin 300 liegt unter 0,1% (w/w)
3. Die zur Herstellung der Referenzseren verwendeten Humanseren wurden auf HbsAg, HCV, HIV-I und HIV-II getestet und als nicht reaktiv befunden. Trotzdem sollten sie - wie alle Humanproben - als potentiell infektiöses Material behandelt werden.
4. Wichtig: Alle Kitkomponenten wurden einzeln getestet und standardisiert. Bestandteile verschiedener Packungen nicht untereinander austauschen.
5. Benutzen Sie für jede Probe, Kontrolle und jedes Reagenz neue Pipettenspitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden
6. TMB-Substrat reizt Haut und Schleimhäute. Nach eventuellem Kontakt Augen mit reichlich Wasser spülen, bei Hautkontakt mit reichlich Wasser und Seife waschen. Verunreinigte Gegenstände vor der Wiederverwendung waschen. Nach Inhalieren von TMB-Substrat die Person an die frische Luft bringen.
7. Ist die Verpackung des Tests beschädigt, überprüfen Sie bitte den Inhalt des Testkits, und vergleichen Sie ihn mit der Inhaltsangabe auf der Packungsbeilage. Stellen sie sicher, dass alle dort aufgeführten Artikel vollständig und unbeschädigt sind. Überprüfen Sie besonders sorgfältig die Vakuum-Beutel, welche die Mikrotiterplatten enthalten auf eventuelle Beschädigungen. Falls Reagenzien ausgelaufen sind oder die Vakuum-Beutel beschädigt sind, kann der Test nicht mehr verwendet werden.
8. Alle Materialien, die Humanserum enthalten oder damit in Kontakt geraten sind, sowie Reste als potentiell infektiös behandeln und entsprechend den lokalen gesetzlichen Bestimmungen als Sondermüll entsorgen.

Literatur

1. Dieterich W. et al. "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease." Nat Med. 1997 Jul;3(7):797-801.
2. Sblattero D. et al. "Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease." Am J Gastroenterol 2000 May;95(5):1253-7.
3. Cataldo F. et al. "IgG(1) antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patientswith selective IgA deficiency". Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue." Gut. 2000 Sep;47(3):366-9.
4. Picarelli A. et al. "Identification of a new coeliac disease subgroup: antiendomysial and anti-transglutaminase antibodies of IgG class in the absence of selective IgA deficiency." J Intern Med. 2001 Feb;249(2):181-8.
5. Baldas V. et al. "Development of a novel rapid noninvasive screening test for coeliac disease." Gut. 2000 Nov;47(5):628-31.

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG CE

96 Tests, Kat. ITC30305

Revisionsdatum: 2010.05.28

Vertrieb durch: Human

Eurospital SpA
34147 Trieste, via Flavia 122
Tel. +39 040 8997.1 - Fax +39 040 280944
www.eurospital.com - info@eurospital.com

IMTEC Human Diagnostics Worldwide

IMTEC — Human — Diagnostics Worldwide

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG

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

Pour usage diagnostique in vitro seulement

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

Principe du test
IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG est un dosage immunoenzymatique de type sandwich. La transglutaminase tissulaire recombinante humaine est coatée sur les puits de la microplaque. 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-IgG humaine marqué à la peroxydase du raifort 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 IgG 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
Conjugué (anti-IgG humaine, chèvre)	1 x 15 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-IgG humaine, chèvre)
1 flacon de 15 ml d'anticorps de chèvre anti-IgG humaine, marqués à la peroxydase du raifort, dans une solution tamponnée avec du Proclin 300 comme conservateur.
3. Calibrateurs
5 flacons contenant 1,5 ml de sérum positif (human) 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.
7. Substrat (TMB)
1 flacon de 15 ml de substrat chromogène avec du Proclin 300 comme conservateur.
8. Solution de lavage
1 flacon de 50 ml de solution concentrée (20x) avec détergeant 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 microplaque (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 sérums différents testés 6 fois chacun en une seule série, les résultats sont les suivants:

Sérum	1	2	3	4	5
Moyenne (U/ml)	12.60	42.98	8.32	12.01	11.0
D.S.	1.571	4.414	0.409	0.800	0.778
CV%	12.5	10.3	4.9	6.7	7.1

2. Variations inter-essai
Pour 5 sérums différents testés en double lors de 3 séries différentes, les résultats sont les suivants:

Sérum	1	2	3	4	5
Moyenne (U/ml)	13.73	46.23	8.93	13.47	11.73
D.S.	1.097	2.909	0.808	0.902	0.153
CV%	8.0	6.3	9.0	6.7	1.3

3. Variations inter-lot
Pour 5 sérums différents testés en double avec 3 lots différents, les résultats sont les suivants:

Sérum	1	2	3	4	5
Moyenne (U/ml)	10.32	17.60	14.57	19.27	42.25
D.S.	0.681	0.265	1.549	0.778	0.876
CV%	6.6	1.5	10.6	4.0	2.1

4. Sensibilité
La sensibilité du test sur un panel de sérums de 179 malades coeliaques confirmés est de **58,7%**.
5. Spécificité
La spécificité du test sur un panel de sérums de 276 sujets sains est de **94,6%**.

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 s'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 IgG 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 traumatisante. 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 IgG 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
Attendre que tous les réactifs soient à température ambiante avant de commencer le test. Définir le nombre de sérums à tester dans la série. Préparer les échantillons en diluant chacun des sérum au 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**. Vérifier 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. A 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-IgG 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 duplicats des calibrateurs et échantillons. Reporter les DO moyennes des calibrateurs sur l'axe Y correspondant à leurs concentrations (axe 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 imprimées sur le flacon. La gamme des valeurs du contrôle négatif et du contrôle positif est imprimée 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 IgG
Négatif	< 20,0 U/ml
Positif	≥ 20,0 U/ml

Interprétation des résultats
Afin d'obtenir un véritable diagnostic sérologique à l'aide des coffrets IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA et IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG, il est préférable de se référer au tableau 1.

Sujets sans déficit total en IgA dans le sérum	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Positif ≥ 16	Positif ≥ 20
Résultats sérologiques positifs pour la maladie cœliaque.	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Douteux 9 ÷ 16	Positif ≥ 20
Résultats sérologiques positifs pour la maladie cœliaque. Détermination du HLA DQ2/DQ8 recommandée.	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Negatif < 9	Negatif < 20
Résultats sérologiques négatifs pour la maladie cœliaque	

Sujets avec déficit total en IgA dans le sérum	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Negatif < 9	Negatif < 20
Résultats sérologiques négatifs pour la maladie cœliaque.	
t-Transglutaminase IgA	t-Transglutaminase IgG
Negatif < 9	Positif ≥ 20
Résultats sérologiques positifs pour la maladie cœliaque. Détermination du HLA DQ2/DQ8 et vérification d'un déficit total en IgA dans le sérum recommandée.	

Limites du test
1. Les résultats obtenus grâce à ce test doivent être utilisés uniquement comme une aide au diagnostic.
2. La reproductibilité des résultats dépend de la précision du pipetage, du respect des temps et des températures d'incubation, de la qualité du lavage et de la préparation des réactifs.
Précautions
1. Attendre que les réactifs soient à température ambiante (15-25°C) avant d'effectuer le test.
2. La concentration en Proclin utilisé comme conservateur dans les réactifs est inférieure à 0,1% (p/p).
3. Les sérums de contrôle humains utilisés dans le coffret ont été testés et se sont avérés négatifs pour l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (AgHBs), pour l'anticorps du virus de l'hépatite C (VHC) et du virus HIV I et II (VIH 1 & 2). Il est cependant conseillé de les considérer comme potentiellement infectieux et de les manipuler avec précautions.
4. Attention: tous les composants du coffret ont été testés et standardisés comme faisant partie d'une seule unité. Ne pas inter changer les réactifs de différents lots.
5. Changer d'embout de pipette pour chaque échantillon, contrôle et réactif afin d'éviter les contaminations.
6. Le substrat TMB irrite la peau et les muqueuses. En cas de contact se rincer abondamment les yeux, savonner la peau et rincer abondamment. Laver les objets contaminés avant de les utiliser à nouveau. En cas d'inhalation, évacuer la personne vers une zone aérée.
7. En cas de dommage du coffret externe, vérifier que tous les réactifs mentionnés dans la composition du coffret sont complets et intacts. Vérifier, en particulier, la présence de vide dans le sachet contenant les puits. Si les flacons sont vides ou si le vide est absent du sachet, le coffret ne doit pas être utilisé.
8. Considérer le matériel contenant du sérum humain ou ayant été en contact avec celui-ci ainsi que les réactifs résiduels comme des déchets dangereux et les éliminer selon les normes en vigueur.

Bibliographie

1. Dieterich W. et al. "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease." Nat Med. 1997 Jul;3(7):797-801.
2. Sblattero D. et al. "Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease." Am J Gastroenterol 2000 May;95(5):1253-7.
3. Cataldo F. et al. "IgG(1) antiendomysium and IgG anti-tissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency". Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue." Gut. 2000 Sep;47(3):366-9.
4. Picarelli A. et al. "Identification of a new coeliac disease subgroup: antiendomysial and anti-transglutaminase antibodies of IgG class in the absence of selective IgA deficiency." J Intern Med. 2001 Feb;249(2):181-8.
5. Baldas V. et al. "Development of a novel rapid non invasive screening test for coeliac disease." Gut. 2000 Nov;47(5):628-31.

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG CE

REF: ITC30305

Coffret complet pour 96 tests

Date de révision: 2010.05.28

Distribué par: Human

Eurospital SpA
34147 Trieste, via Flavia 122
Tel. +39 040 8997.1 - Fax +39 040 280944
www.eurospital.com - info@eurospital.com

IMTEC — Human — Diagnostics Worldwide

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG

Ensayo inmunoenzimático para la determinación de los anticuerpos IgG específicos a la transglutaminasa tisular en el suero humano.

Para uso diagnóstico in vitro.

Uso previsto
IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG se emplea para efectuar la determinación cuantitativa de los anticuerpos específicos IgG dirigidos contra la enzima transglutaminasa tisular en el suero humano.

Principios del método
IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG es un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich. La enzima transglutaminasa tisular recombinante humana se fija a los pocillos de microtitulación. Los anticuerpos específicos de dicho antígeno, que se hallan en el suero del paciente, se fijan al propio antígeno. Los anticuerpos inespecíficos se eliminan mediante lavado. Acto seguido, se añaden anticuerpos de oveja anti-IgG humanos, marcados con peroxidasa, que se fijan a los anticuerpos que han quedado adheridos al fondo del pocillo. El conjugado en exceso se elimina mediante lavado. A continuación, se añade un sustrato cromógeno. Se incuba una vez más y se mide el valor de Densidad Óptica (D.O.) con el lector de microplacas al efecto.

Material suministrado

Fase sólida (antígeno humano recombinante)	12x8 pocillos
Conjugado (anti-IgG humana, oveja)	1x15 ml
Calibrador (humano)	5x1,5 ml
Control positivo (humano)	1x1,5 ml
Control negativo (humano)	1x1,5 ml
Diluyente para muestras	2x50 ml
Sustrato	1x15 ml
Solución de lavado (20x)	1x50 ml
Solución de parada	1x15 ml

Composición de los materiales/reactivos suministrados
1. Fase sólida
12 tiras de 8 pocillos cada una, con antígeno recombinante humano adsorbido. Vienen selladas al vacío en una bolsa de polietileno que contiene un desecante.
2. Conjugado (anti-IgG humana, ovejo)
Un frasco con 15 ml de anticuerpo anti-IgG humana (oveja), marcado con peroxidasa, en solución tampón, con Proclin 300 como conservante.
3. Calibradores
5 viales con 1,5 ml de suero positivo (humano) en solución tampón con Proclin 300 como conservante. Los valores de los calibradores (en U/ml) están indicados en la etiqueta. Los calibradores están listos para usar.
4. Control positivo
Un vial con 1,5 ml de suero de control positivo (humano) en solución tampón con Proclin 300 como conservante. El control está listo para usar.
5. Control negativo
Un vial con 1,5 ml de suero de control negativo (humano) en solución tampón con Proclin 300 como conservante. El control está listo para usar.
6. Diluyente para muestras
Dos frascos con 50 ml de solución tampón, con Proclin 300 como conservante.
7. Sustrato cromogénico
Un frasco con 15 ml de solución tampón cromogénica.
8. Solución de lavado
Un frasco con 50 ml de solución concentrada (20x) con detergentes y Proclin 300 como conservante.
9. Solución de parada
Un frasco con 15 ml de disolución 0.5 M de ácido sulfúrico.

Instrumentos y materiales necesarios que no se suministran en el kit
1. Lector para microplacas (450 nm)
2. Pipetas de precisión (5, 100 y 1000 µl)
3. Agua destilada.

Indicaciones del procedimiento y límites del método
El método permite detectar los anticuerpos humanos contra la transglutaminasa tisular, merced a lo cual se puede diferenciar entre la población de pacientes aquejados por la enfermedad celíaca y la población sana. El rango dinámico del sistema oscila entre 0 y 100 unidades (U/ml).
1. Variabilidad intra-ensayo
5 sueros de referencia fueron analizados en 6 veces, durante un mismo ensayo. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Suero	1	2	3	4	5
Media (U/ml)	12.60	42.98	8.32	12.01	11.0
Desv. Estándar	1.571	4.414	0.409	0.800	0.778
CV%	12.5	10.3	4.9	6.7	7.1

2. Variabilidad inter-ensayo
5 sueros de referencia fueron analizados por duplicado, en 3 ensayos diferentes. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Suero	1	2	3	4	5
Media (U/ml)	13.73	46.23	8.93	13.47	11.73
Desv. Estándar	1.097	2.909	0.808	0.902	0.153
CV%	8.0	6.3	9.0	6.7	1.3

3. Variabilidad inter-lote
5 sueros de referencia fueron analizados por duplicado en 3 lotes diferentes. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Suero	1	2	3	4	5
Media (U/ml)	10.32	17.60	14.57	19.27	42.25
Desv. Estándar	0.681	0.265	1.549	0.778	0.876
CV%	6.6	1.5	10.6	4.0	2.1

4. Sensibilidad diagnóstica
Se ensayaron sueros de 179 pacientes celíacos adultos clínicamente diagnosticados. El resultado encontrado fue de 58,7%.
5. Especificidad diagnóstica
Se ensayaron sueros de 276 sujetos sanos. El valor encontrado fue de 94,6%.

Conservación
Todos los reactivos se conservarán a 2-8°C y se utilizarán antes de la fecha de caducidad que se aprecia en la etiqueta. Evitar exposiciones a altas temperaturas, luz solar directa o condiciones de extrema humedad.
Estabilidad después del primer uso
Todos los componentes del kit son estables 60 días en su contenedor habitual y guardados a 2-8°C.
Estabilidad durante el transporte
Un test acelerado de estabilidad ha probado que todos los reactivos siguen estables después de 96 horas a 37°C.

Preparación de los reactivos
Solución de lavado
Para preparar la solución de lavado, diluya el frasco suministrado con agua destilada o desionizada hasta obtener un volumen de 1000 ml.

Recogida de muestras
IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG requiere el uso de suero. Es importante preservar la integridad de la muestra de sangre, desde el momento de la extracción hasta que se realice el ensayo. La sangre se extraerá mediante una técnica no traumática. Deje que la sangre se coagule durante 20-30 minutos, como mínimo, para facilitar la retracción del coágulo. Antes de centrifugar, despegue el coágulo de las paredes de la probeta. No es necesario añadir conservantes a la muestra de suero para preservar su integridad. Las muestras se conservarán a 2-8°C y se analizarán lo más tarde 24 horas después de la extracción. Si el análisis no se puede realizar en un plazo de 24 horas, congele la muestra de suero. No congele y descongele varias veces. No usar congeladores-descongeladores automáticos ya que las muestras pueden verse afectadas si se repiten ciclos de congelación-descogelación, debido a una desnaturalización de los anticuerpos IgG que podría dar lugar a resultados erróneos. Evitar el uso de muestras lipémicas, hemolizadas o contaminadas.

Dilución de la muestras
Antes de usar las muestras, hay que diluirlas a 1:101 (10 µl de suero en 1 ml de diluyente de muestras). La dilución que se obtiene de esta manera se puede conservar durante 24 horas a 4°C o durante una semana a -20°C.

Procedimiento
Antes de comenzar el ensayo, aguarde hasta que todos los reactivos lleguen a la temperatura ambiente. Establezca la cantidad de suero de los pacientes que se requiere para terminar los ensayos. Prepare las muestras diluyendo cada suero a 1:101 y mezcle bien. No hay que diluir el calibrador ni los controles positivo y negativo, y todos se deberían incluir en cada ensayo. Introduzca los pocillos necesarios en el soporte, cerciorándose de que todos los pocillos queden bien ubicados y no sobresalgan.
1. Coloque 100 µl de cada calibrador en duplicado en los primeros pocillos (A1-B1, ... A2-B2).
2. Coloque 100 µl del control negativo, 100 µl de control positivo y 100 µl de las muestras diluidas en los pocillos restantes.
3. Tape la placa, a fin de evitar que se evapore el contenido e incube durante 45 minutos a temperatura ambiente.
4. Al final de la incubación, ponga los pocillos boca abajo y dé un golpe seco para eliminar todo el líquido.
5. Para lavar los pocillos, coloque 300 µl/pocillo de solución de lavado y póngalos boca abajo para eliminar completamente el líquido.
6. Repita el lavado tres veces.
7. Coloque 100 µl de conjugado anti-IgG en todos los pocillos.
8. Tape la placa para que el contenido no se evapore e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Repita los lavados, según las instrucciones ya comentadas.
10. Coloque en cada pocillo 100 µl de sustrato.
11. Tape la placa para que el contenido no se evapore e incube durante 15 minutos a temperatura ambiente.
12. Coloque en cada pocillo 100 µl de solución de parada.
13. Lea los resultados con el lector ELISA, utilizando un filtro de 450 nm.

Cálculo de los resultados obtenidos
Mediante una recta de regresión de tipo punto a punto, obtendremos los resultados del análisis. En caso de cálculo manual, es necesario utilizar los valores de calibradores y muestras por duplicado. Realice una gráfica utilizando los valores de D.O. en el eje de las Y y la concentración de calibradores en el eje de la X usando ejes lin-lin en un papel adecuado. La curva de calibración obtenida se usará para calcular la concentración en U/ml de cada muestra.

Control de Calidad
El valor de D.O. del Calibrador S5 tiene que ser superior a 1,3. Es posible utilizar el filtro de 620 nm para realizar la lectura. Tras añadir la solución de parada, los valores de D.O. de 0,6 corresponden aproximadamente a valores de 1,8 - 2,0 de D.O. a 450 nm. Las concentraciones de los Calibradores se observan en la etiqueta del vial. Los rangos del control positivo y del control negativo se observan en la etiqueta del vial. Si el valor está fuera del rango, hay que repetir el ensayo. Si el ensayo vuelve a arrojar alguno de los datos susodichos, contacte con el fabricante. El certificado de entrega del producto está disponible en los establecimientos del fabricante y se puede remitir bajo demanda.

Valores de referencia
Según las buenas prácticas de laboratorio, es conveniente que todos los laboratorios calculen sus propios valores normales. Para efectuar dicho cálculo, emplee un número estadísticamente significativo de sueros, antes de asignarle un significado clínico particular a la determinación. Es necesario que todos los laboratorios calculen su propio valor de cut-off. Un análisis interno obtuvo los siguientes valores de cut-off:

valores negativos	< 20,0 U/ml
Valores positivos	≥ 20,0 U/ml

Interpretación de los resultados
Para alcanzar un diagnóstico serológico correcto se recomienda el uso combinado de los equipos IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgA y IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG, y referirse a la siguiente tabla.

Pacientes sin deficienza total de IgA en suero	
T-Transglutaminasa IgA	T-Transglutaminasa IgG
Positivo ≥ 16	Positivo ≥ 20
Serología positiva para enfermedad celíaca.	
T-Transglutaminasa IgA	T-Transglutaminasa IgG
Dudoso 9 ÷ 16	Positivo ≥ 20
Serología positiva para enfermedad celíaca. Se recomienda el tipaje HLA DQ2/DQ8	
T-Transglutaminasa IgA	T-Transglutaminasa IgG
Negativo < 9	Negativo < 20
Serología negativa para enfermedad celíaca	

Pacientes con deficienza total de IgA en suero	
T-Transglutaminasa IgA	T-Transglutaminasa IgG
Negativo < 9	Negativo < 20
Sierologia negativa per malattia celiaca	
T-Transglutaminasa IgA	T-Transglutaminasa IgG
Negativo < 9	Positivo ≥ 20
Serología positiva para enfermedad celíaca. Posible deficiencia total de IgA en suero. Se recomienda el tipaje HLA DQ2/DQ8 y la determinación de IgA total en suero.	

Limitaciones del procedimiento
1. Los resultados obtenidos con este ensayo tienen que ser usados solamente como soporte al diagnóstico.
2. La reproducibilidad de los resultados depende de una técnica de pipeteo precisa, de una aplicación exacta de los tiempos y temperaturas de incubación y de lavado y de una correcta preparación de los reactivos.

Medidas de precaución
1. Atemperar todos los reactivos a temperatura ambiente (15-25ºC) antes de empezar el ensayo.
2. La concentración de Proclin utilizada como conservante en las soluciones de reactivos es inferior a 0,1% (p/p).
3. Los sueros que se han utilizado para los controles de este equipo arrojaron resultados negativos durante los análisis para la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y de los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV I y II. Sin embargo, es aconsejable manipularlos como si se tratara de material potencialmente infeccioso.
4. ¡Cuidado!: Todos los componentes del kit han sido probados y estandarizados como unidades individuales. Es sumamente importante no mezclar componentes de lotes diferentes.
5. Utilizar puntas nuevas para cada muestra, control y reactivos, a fin de evitar reacciones de contaminación.
6. La solución sustrato-TMB es irritante en contacto con la piel y las mucosas. En caso de contacto, lávese los ojos con abundante agua corriente y lave la piel con jabón y agua en abundancia. Lave los objetos contaminados antes de volver a usarlos. En caso de inhalación, traslade a la persona al aire libre.
7. Si el embalaje exterior se ve dañado, cerciórese de que todos los componentes que se detallan en el listado de "materiales suministrados" se encuentren en el mismo, en perfectas condiciones. En particular, controle que la bolsa de polietileno con los pocillos esté al vacío. Si los frascos pierden líquido, o si la bolsa no está al vacío, no utilice el equipo.
8. Cualquier material que contenga suero humano o que haya estado en contacto previo con este y todos los reactivos del ensayo tienen que ser desechados como residuos peligrosos. Desechar siguiendo las leyes locales.

Bibliografía

1. Dieterich W. et al. "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease." Nat Med. 1997 Jul;3(7):797-801.
2. Sblattero D. et al. "Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease." Am J Gastroenterol 2000 May;95(5):1253-7.
3. Cataldo F. et al. "IgG(1) antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patientswith selective IgA deficiency". Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue." Gut. 2000 Sep;47(3):366-9.
4. Picarelli A. et al. "Identification of a new coeliac disease subgroup: antiendomysial and anti-transglutaminase antibodies of IgG class in the absence of selective IgA deficiency." J Intern Med. 2001 Feb;249(2):181-8.
5. Baldas V. et al. "Development of a novel rapid noninvasive screening test for coeliac disease." Gut. 2000 Nov;47(5):628-31.

IMTEC-t-Transglutaminase Antibodies IgG CE

REF: ITC30305

96 ensayos Fecha de revisión: 2010.05.28

Distribuido por: Human

Eurospital SpA
34147 Trieste, via Flavia 122
Tel. +39 040 8997.1 - Fax +39 040 280944
www.eurospital.com - info@eurospital.com

IMTEC — Human — Diagnostics Worldwide