



KÓD 44704	96 testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagencie pro stanovení anti-gliadinových protilátek Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích	

ANTI-GLIADINOVÉ PROTILÁTKY

ELISA
MIKROTIČAČNÍ DESTIČKY

PRINCIP METODY

Anti-gliadinové protilátky (AGA) ze séra se váží na antigen navázaný na povrchu mikrotitračních destiček. V průběhu druhé inkubace se váže konjugát (křenovou peroxidázou značené imunoglobuliny proti lidskému IgA/IgG) s protilátkami navázanými na povrchu jamky. Nakonec se přidává 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) s H₂O₂ do každé jamky jako enzymový substrát. Vzniklá enzymatická barevná reakce je zastavena kyselinou. Žluté zbarvení reakce se měří při 450 nm a intenzita absorbance je úměrná koncentraci AGA protilátek ve vzorku¹.

OBSAH A SLOŽENÍ

- A. Koncentrovaný promývací roztok.** 50 mL. Fosfátový pufr 0,6 mol/L, neiontový detergent 6 g/l, azid sodný 15 mmol/l, pH 7,6.
- B. Ředící roztok** 100 mL. Fosfátový pufr 30 mmol/l, chlorid sodný 0,3 mol/l, hovězí albumin 5 g/l, neiontový detergent 0,5 g/l, azid sodný 15 mmol/l, pH 6,7. Modře zbarvený roztok.
- C+. IgA Pozitivní kontrola.** 1 mL. Ready to use. Sérum s anti-gliadinovými IgA protilátkami, azid sodný 15 mmol/L.
- C+. IgG Pozitivní kontrola.** 1 mL. Ready to use. Sérum s anti-gliadinovými IgG protilátkami, azid sodný 15 mmol/L.
- C-. Negativní kontrola.** 2 mL. Lidské sérum bez anti-gliadinových protilátek, azid sodný 15 mmol/L.
- DA. IgA Konjugát.** 12 mL. Křenovou peroxidázou značený imunoglobulin proti lidskému IgA. Zeleně zbarvený roztok.
- DG. IgG Konjugát.** 12 mL. Křenovou peroxidázou značený imunoglobulin proti lidskému IgG. Žlutě zbarvený roztok.
- E. Substrát.** 12 mL. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB).
- F. Zastavovací roztok** - 15 mL. Kyselina sírová 0,5 mol/L.
H314 – Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.
P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P303 + P361 + P353 – PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy):
 Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte.
 Opláchněte kůži vodou/osprchujte.
- M. Mikrotitrační destičky:** 12 modulů po 8 rozlamovatelných jamkách s navázaným gliadinem.
- S1A-S6A. Anti-gliadinové IgA standardy,** kalibrované proti internímu referenčnímu standardu. Každý po 1 mL. Ready to use. Anti-gliadinové lidské sérum, azid sodný 15 mmol/L. Koncentrace anti-gliadinových IgA protilátek jsou: 0, 25, 50, 100, 150 a 200 U/L, jak je uvedeno na štítku lahviček.
- S1G-S6G. Anti-gliadinové IgG standardy,** kalibrované proti internímu referenčnímu standardu. Každý po 1 mL. Ready to use. Anti-gliadinové lidské sérum, azid sodný 15 mmol/L. Koncentrace anti-gliadinových IgG protilátek jsou: 0, 10, 20, 50, 100 a 200 U/L, jak je uvedeno na štítku lahviček.

Pro další varování a doporučení – viz Karta bezpečnostních údajů (SDS).

Lidská séra použitá při přípravě pozitivní a negativní kontroly byla testována a sledována negativní na přítomnost protilátek anti-HIV a anti-HCV, a stejně tak na HBs antigen. Nicméně zacházejte s kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.

SKLADOVÁNÍ

Skladujte při 2-8°C.

Reagencie jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno kontaminaci v průběhu jejich užívání.

Známky zhoršení kvality:

- Kapalně komponenty: Přítomnost částic, zákal
- Mikrotitrační destičky: natržení sáčku, makroskopické defekty jako je poškrábání dna jamek.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Promývací pufr: Zředte koncentrovaný promývací pufr A destilovanou vodou v poměru 1/25. Pořádně promíchejte. Pro 1 strip se spotřebuje přibližně 50 ml promývací reagentie. Roztok je stabilní 7 dnů při 2-8°C.

Ostatní činidla jsou připravena k přímému použití - ready to use.

PŘIDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- zvlhčovací komůrka
- promývací zařízení pro mikrotitrační destičky
- reader mikrotitračních destiček, nebo fotometr s mikrokyvetou a filtrem 450 ± 10 nm.

VZORKY

Sérum nebo plazma odebraná standardním způsobem.

Stabilita 1 týden při 2-8°C.

Vzorek před testováním zředte v poměru 1/400 ředícím pufr (B).

PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte všechna činidla na pokojovou teplotu.
2. Otevřete balíček s mikrotitračními destičkami a vyjměte požadované množství pro stanovení (Poznámka 2).
3. **Postup práce:**
 - **Kvantitativní stanovení:** Pipetujte po 100 µl každého standardu (S1-S6), Pozitivní kontroly (C+), Negativní kontroly (C-) a zředěného vzorku do odlišných jamek.
 - **Kvalitativní stanovení:** Pipetujte 100 µL Negativní kontroly (C-), Pozitivní kontroly (C+) a zředěného vzorku do odlišných jamek. Pipetujte 100 µL ředícího roztoku (B) jako blank.
4. Stripy umístěte do zvlhčovací komůrky a inkubujte je při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
5. Odsajte obsahy jamek a jamky promyjte 4-krát po 300 µl promývacího pufru vždy po dobu nejméně 10 sekund (Poznámka 3 a 4).
6. Pipetujte do všech jamek 100 µl konjugát (D).
7. Inkubujte stripy podle odstavce č. 4.
8. Promyjte jamky podle odstavce č. 5.
9. Pipetujte 100 µl substrátu (E) do všech jamek.
10. Stripy inkubujte ve zvlhčovací komůrce při pokojové teplotě po dobu 15 minut.
11. Pipetujte 100 µl zastavovacího roztoku (F) do všech jamek. (Poznámka 5).
12. Odečtěte absorbanci jednotlivých jamek při 450 nm za použití S1 standardu nebo jamky blanku pro vynulování přístroje. Zbarvení je stabilní alespoň 30 minut.

VÝPOČET

Kvantitativní stanovení: Vyneste do grafu absorbanční hodnoty pro každý standard proti koncentraci AGA protilátek (U/L). Koncentrace anti-gliadinových protilátek přítomných ve vzorku se vypočítá interpolací absorbance na kalibrační křivce (doporučená křivka: 4-parametrická logistická, cubic spline, jednostranná hyperbola).

Kvalitativní stanovení: Vypočtete absorbanci Cut-off následovně:

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} \text{ Pozitivní kontrola} \times 0,18 \text{ (IgA)}$$

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} \text{ Pozitivní kontrola} \times 0,36 \text{ (IgG)}$$

Vypočtete absorbanční poměr:

$$\text{Absorbanční poměr} = \frac{A_{450 \text{ nm}} \text{ Vzorku}}{A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off}}$$



KÓD 44704	96 testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagencie pro stanovení anti-gliadinových protilátek Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích	

ANTI-GLIADINOVÉ PROTILÁTKY

ELISA
MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

Když jsou hodnoty absorbancí vyšší než je horní měřicí limit readeru, vzorky nafaďte reagensy (B) a stanovení opakujte.

REFERENČNÍ HODNOTY

Vzorky, s koncentrací vyšší jak 18 U/L pro IgA a nad 24 U/L pro IgG, nebo které mají vyšší absorbanční poměr jak 1,1 jsou považovány za pozitivní.

Vzorky, s koncentrací nižší jak 12 U/L pro IgA a 16 U/L pro IgG, nebo které mají nižší absorbanční poměr jak 0,9 jsou považovány za negativní.

Vzorky, s koncentrací mezi 12 až 18 U/L pro IgA a mezi 16 až 24 U/L pro IgG, nebo které mají absorbanční poměr mezi 0,9 až 1,1 jsou považovány za nejasné a doporučuje se opakování analýzy. Zvažte další testování pro diferenciální diagnózu.

Uvedené hodnoty jsou pouze orientační. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí.

KONTROLA KVALITY

Koncentrace Pozitivních kontrol (C+1 a C+2) by měla být v rozmezí mezi 80 a 120 U/L, a pro Negativní kontrolu (C-) by měla být nižší jak 12 U/L pro IgA a 16U/L pro IgG.

Absorbanční poměr pro Pozitivní kontrolu (C+) by měl být vyšší než 1,1 a pro Negativní kontrolu (C-) by měl být nižší než 0,9.

Každá laboratoř by si měla stanovit svojí vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

U/L IgA	CV %	n	U/L IgG	CV%	n
20	5,6	25	45	9,0	25
76	12,4	25	83	10,5	25

- Reprodukovatelnost (run to run):

U/L IgA	CV %	n	U/L IgG	CV%	n
20	5,7	25	45	8,1	25
76	9,2	25	83	15,2	25

- Detekční limit: 0,5 U/L (IgA) a 0,2 U/L (IgG)

- Rozsah měření: 0,5 – 200 U/L (IgA) a 0,2-200 U/L (IgG). Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředit vzorek ředícím pufrům (B) a opakujte stanovení.

- Správnost: Výsledky získané touto soupravou nevykazovaly systematické rozdíly při porovnání s referenčními činidly. Podrobnosti o porovnávací zkoušce jsou k dispozici na vyžádání.

- Interference: Hemoglobin nad 500mg/dL, triglyceridy nad 1625mg/dL, bilirubin nad 30mg/dL a revmatoidní faktor nad 300 IU/mL neinterferují.

Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat².

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Enzymová immunoassay (ELISA) pro anti-gliadinové protilátky vykazuje velkou heterogenitu v senzitivitě a specifitě v závislosti na studiích a populaci.³

Pro celiakii se senzitivita pohybuje v rozmezí 80 – 90% pro protilátky IgA a 70-100% pro IgG protilátky. Specifita je 80-90% pro IgA protilátky a 70-90% pro IgG protilátky³.

Klinická diagnóza by neměla být stanovena jen na základě výsledku jednoho testu, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

POZNÁMKA

1. Nezaměřujte reagencie ze souprav různých šarží.
2. Skladujte nepoužité jamky v plastickém sáčku a uzavřené společně s vysoušecím sáčkem po dobu max. 12 měsíců.
3. Zabraňte poškození vnitřního povrchu mikrotitračních destiček.
4. Promývací roztok by měl být kompletně odstraněn z jamek.
5. Zastavovací roztok (F) enzymové reakce musí být pipetován do jamek přibližně ve stejném časovém odstupu jako substrát (E) v odstavci č.9.

LITERATURA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
3. Rostom A, Dubé C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garrity C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Mamaladze V, Pan I, MacNeil J, Mack D, Patel D, Moher D. The Diagnostic Accuracy of Serologic Tests for Celiac Disease: A Systematic Review. Gastroenterology 2005;128: S38-S46.

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 2.9.2019

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí.

Originální návod najdete v soupravě a na internetové adrese:

www.biosystems.es.

Český návod je k dispozici na: www.iktrading.cz

Výhradní distributor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha 5,
tel.: +420 257 220 760

SK : JK-Trading spol.s.r.o., Dlhá 43, 900 31, Stupava
tel.: + 421 264 774 591

V případě mimořádných událostí:

ČR : Toxikologické informační středisko (TIS), klinika pracovního lékařství VFN a LF UK,

tel.: +420 224 91 92 93 a +420 224 91 54 02

SK : Toxikologické informačné centrum Bratislava, 833 05, Limbová 5, tel.: +421 254 774 166