CE

DiaMetra
care for quality

DCM109-9
Ed. 09/2018

Anti Tissue Transglutaminase IgG

per analisi di routine

Determinazione quantitativa degli anticorpi IgG contro la transglutaminasi tissutale nel siero o plasma umano.

IVD | **LOT** Vedere etichetta esterna | 2°C 8°C | Σ = 96 test | **REF DKO109**

DESTINAZIONE D'USO
Il kit Anti Tissue transglutaminase IgG kit è un metodo immunoenzimatico colorimetrico (ELISA) indiretto per la determinazione degli anticorpi IgG contro la transglutaminasi tissutale nel siero o plasma umano. Questo test è per uso in vitro come supporto per la diagnosi della malattia celiaca e la dermatite erpetiforme.
Il kit Anti Tissue Transglutaminase IgG è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

La malattia celiaca è caratterizzata da infiammazione cronica della mucosa intestinale con appiattimento dell'epitelio (atrofia villosa positiva). La causa della malattia celiaca è l'intolleranza al glutine, proteina contenuta nel grano, nella segale e nell'orzo. I sintomi più evidenti sono diarrea, problemi gastrointestinali, anemia, affaticamento, problemi psichici; alcuni soggetti possono essere asintomatici.
La remissione clinica e la normalizzazione della mucosa in seguito a dieta priva di glutine rappresentano un dato oggettivo che l'enteropatia è indotta dal glutine.
La diagnosi di morbo celiaco è confermata dai reperti anormali nelle biopsie intestinali e successivamente verificata dalla risposta clinica a una dieta priva di glutine, ad esempio evitando frumento, segale, avena e triticale. Lasciati senza trattamento, i pazienti affetti da celiachia mostrano un rischio aumentato per linfomi e neoplasie gastrointestinali. Inoltre, anche se asintomatica, la malattia celiaca di vecchia data non trattata predispone per altre malattie autoimmuni, quali diabete mellito, malattie reumatoidi, epatiti e tiroiditi autoimmuni. La European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) ha tracciato delle linee guida per la diagnosi di morbo celiaco che comprendono: una prima biopsia intestnale positiva, 6 mesi di dieta priva di glutine, una seconda biopsia intestinale negativa, un test con glutine per 6 mesi e infine una terza biopsia intestinale positiva. Recentemente, la messa a punto di test sierologici ha permesso di modificare tali linee guida in modo da giungere a una diagnosi più rapidamente. Tali nuovi criteri comprendono: una singola biopsia intestinale positiva e la dimostrazione della presenza di almeno due anticorpi IgA verso la gliadina, l'endomisio o la transglutaminasi.
L'enzima tissutale Transglutaminasi (tTG) è stato identificato come il principale, se non l'unico, bersaglio per gli anticorpi endomisiali. Tali anticorpi si abbassano una volta che si è iniziata una dieta priva di glutine, permettendo quindi di controllare il rispetto della dieta. Gli autoanticorpi anti Tissue Transglutaminase IgG rappresentano un marcatore estremamente sensibile (95-100%) con una specificità del 90-97%. Negli ultimi anni è stato prodotto un antigene tTG ricombinante che consente di avere notevoli vantaggi rispetto all'antigene tradizionale ricavato dal fegato di cavia.
Esiste una certa percentuale di pazienti che non produce IgA e come tale in passato rappresentava la causa dei falsi negativi nei pazienti con malattia celiaca confermata mediante biopsia. Per eliminare i falsi negativi, molti laboratori eseguono anche la determinazione delle IgG su numerosi sieri testati per la presenza di anticorpi presenti nella malattia celiaca. La maggior parte dei pazienti celiaci che non producono IgA risultano positivi per la presenza di IgG, anti-reticolina ed anti-gliadina. Studi sull'utilizzo di un test per la ricerca di IgG anti tissue transglutaminase per individuare i pazienti che non producono IgA hanno dimostrato che la sensibilità del test è stata aumentata del 91,5% per la sola ricerca di IgA al 98,5% quando venivano considerati i risultati dei test per la ricerca sia di IgA che di IgG.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Anti Tissue transglutaminase IgG si basa sul legame degli anticorpi presenti nel campione con la transglutaminasi tissutale ricombinante umana legata sulle micropiastre. Gli anticorpi presenti nei calibratori, nei controlli e nei campioni prediluiti dei pazienti si legano sulla superficie interna dei pozzetti. Dopo 30 minuti di incubazione, la micropiastra viene lavata con un tampone di lavaggio per rimuovere le componenti del siero che non hanno reagito.
Una soluzione di immunoglobuline anti-human IgG coniugate con perossidasi riconosce gli anticorpi di classe IgG legati agli antigeni immobilizzati. Dopo 30 minuti di incubazione, l'eccesso di coniugato enzimatico che non si è legato specificamente viene rimosso mediante un lavaggio con tampone.
Si aggiunge ai pozzetti una soluzione substrato cromogenica contenente TMB. Dopo 15 minuti di incubazione si blocca lo sviluppo del colore mediante aggiunta della soluzione stop. Il colore della soluzione diventa giallo. La quantità di colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgG presenti nel campione originale.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1,2 mL ciascuno)
Tampone fosfato 0,1M, NaN_3< 0,1%, siero umano

CAL0	**REF DCE002/10906-0**
CAL1	**REF DCE002/10907-0**
CAL2	**REF DCE002/10908-0**
CAL3	**REF DCE002/10909-0**
CAL4	**REF DCE002/10910-0**
CAL5	**REF DCE002/10911-0**

2. Controls (2 flaconi, 1,2 mL ciascuno)
Tampone fosfato 0,1 M, NaN_3< 0,1%, siero umano

Controllo Negativo	**REF DCE045/10901-0**
Controllo Positivo	**REF DCE045/10902-0**

3. Sample Diluent (1 flacone, 100 mL)
Tampone fosfato 0,1 M, NaN_3< 0,1%
REF DCE053-0

4. Conjugate (1 flacone, 15 mL)
Anti h-IgG coniugato con perossidasi, BSA 0,1%,
Proclin < 0,0015% **REF DCE002/10902-0**

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)
Micropiastra con transglutaminasi tissutale ricombinante umana adsorbita **REF DCE002/10903-0**

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)
H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) *(evitare il contatto con la pelle)*
REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)
Acido solforico 0,15M *(evitare il contatto con la pelle)*
REF DCE005-0

8. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)
Tampone fosfato 0,2M pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.
Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce.
Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori ed i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN_3) o di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H_2O_2 a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- **ATTENZIONE**: **il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni**; si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso.
  A tale scopo Dia.Metra rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli

reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.

- L'addizione del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'addizione della Stop Solution. L'addizione del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C_0...C_5)

Dal momento che non sono disponibili preparati di riferimento internazionale per gli anticorpi anti tTG, il sistema di analisi è calibrato in unità relative arbitrarie.
I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
AU/mL	0	5	20	40	80	320

Una volta aperti, i Calibratori sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione del campione

Per l'esecuzione del test si possono utilizzare campioni di siero o di plasma umano. **Tutti i campioni devono essere diluiti 1:100 con sample diluent**; per esempio 10 µL di siero possono essere diluiti a 1000 µL con sample diluent.
I campioni da utilizzare devono essere limpidi. Si consiglia di evitare contaminazioni dovute a iperlipemia, anche se queste non interferiscono con l'analisi. I campioni possono essere conservati refrigerati a 2-8°C fino a 5 giorni, oppure conservati a -20°C fino a 6 mesi. Si consiglia di evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni che potrebbero determinare una perdita variabile dell'attività degli autoanticorpi. Non è raccomandata l'analisi di campioni inattivati al calore.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (10x) con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.
Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL avendo cura di trasferire anche i cristalli con un lavaggio del flacone, poi agitare fino a completa dissoluzione.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C_0-C_5), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibrator	Campione /Controlli	Bianco
Calibrator C_0-C_5	**100 µL**		
Controlli		**100 µL**	
Campione diluito		**100 µL**	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. **Nota importante**: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. **Lavaggi automatici**: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
Coniugato	**100 µL**	**100 µL**	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. **Lavaggi**: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			
TMB Substrato	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce (22-28°C).			
Stop Solution	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO DI QUALITA'

- I Controlli Positivo e Negativo devono essere inclusi ogni volta che si esegue il test per assicurare che tutti i reagenti ed il test funzionino in modo corretto.
- Poichè i Controlli sono prediluiti, essi non rappresentano un controllo procedurale per le tecniche di diluizione utilizzate per i campioni.
- Ulteriori sieri di controllo possono essere preparati raccogliendo un pool dei sieri umani, aliquotandolo e conservandolo a < -20°C.
- Perchè i risultati del test siano considerati validi, tutti i seguenti criteri devono essere soddisfatti. Se anche uno solo non rientra nei valori specificati, i risultati non dovrebbero essere considerati validi ed il test dovrebbe essere ripetuto:
  - L'assorbanza del Controllo Positivo deve essere maggiore di quella del Controllo Negativo.
  - Il Controllo Negativo e quello Positivo servono per controllare un'eventuale malfunzionamento dei reagenti.

e non assicurano la precisione in corrispondenza del valore soglia del test.
- Il test è valido solo se la densità ottica a 450 nm del Controllo Positivo e del Controllo Negativo come pure quelle dei calibratori (C_0-C_5) coincidono con gli intervalli corrispondenti indicati nel Certificato di Controllo di Qualità incluso nel kit.

8. RISULTATI

Per il test Anti Tissue Transglutaminase IgG il metodo di scelta per il trattamento dei risultati è una elaborazione 4 parametri con assi lin-log per densità ottica e concentrazione rispettivamente. Inoltre si possono utilizzare un'approssimazione spline e coordinate log-log. Tuttavia si raccomanda di utilizzare una curva Lin-Log.
Innanzitutto occorre calcolare la media delle densità ottiche relative ai calibratori. Utilizzare un foglio di carta lin-log e tracciare le densità ottiche medie di ogni calibratore verso la rispettiva concentrazione. Disegnare la curva che approssima nel modo migliore tutti i punti di calibrazione. I punti dei calibratori possono anche essere collegati con segmenti di linea retta. La concentrazione dei campioni incogniti può essere determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.
In uno studio sui valori normali eseguito con campioni di siero provenienti da donatori sani sono stati determinati i seguenti intervalli di normalità con il test Anti-tTG-IgG:

Anti Tissue Transglutaminase IgG (AU/mL)	
Cut-Off	20

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.
I risultati positivi dovrebbero essere verificati relativamente allo stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione relativa alla terapia dovrebbe essere presa individualmente. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri intervalli normale e patologico di anticorpi anti tTG sierici.

9. LIMITAZIONI DEL TEST

- La presenza nel campione di complessi immuni o di altri aggregati di immunoglobuline può determinare delle reazioni aspecifiche con conseguenti risultati falsi positivi..
- Un risultato negativo per IgG anti-h-tTG in un paziente non trattato non esclude una enteropatia sensibile al glutine. Il soggetto potrebbe essere positivo al test per la ricerca di IgA oppure non avere anticorpi anti tTG.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione e riproducibilità

La precisione e la riproducibilità sono state valutate testando otto repliche di due campioni positivi in due esperimenti diversi con due lotti di kit differenti.
Le operazioni di dispensazione e lavaggio sono state eseguite da un operatore manualmente.
I risultati in termini di deviazione Calibrator e coefficiente di variazione sono riportati di seguito:

Campione	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-test	12.49	7.1	7.85	6.7
Inter-test	0.36	3.8	12.37	7.5

10.2. Specificità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 32 sieri (di cui 18 positivi e 14 negativi) hanno mostrato una specificità del 90,9%.

10.3. Sensibilità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 32 sieri (di cui 18 positivi e 14 negativi) hanno mostrato una sensibilità del 81,0%.

10.4. Limite di Rilevabilità

La minor concentrazione di anti-tTG IgG che può essere distinta dal Calibratore zero è 0.12 AU/mL con limite di confidenza del 95%.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Williams, C.N. Celiac disease: Past, present and future. Can. J. Gastroenterol., 1997, 11:647-649.
2. Sollid, L.M. Coeliac diasease: Dissecting a complex inflammatory disorder. Nature Rev., 2002, 2:647-655.
3. Fesus, L., And M. Piacentini. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Trends Biochem. Sci., 2002, 27:534-539.
4. Dieterich, W. Et al. Serum antibodies in Celiac Disease. Clin. Lab., 2000, 46:361-364.
5. Dieterich, W. Et al. Autoantibodies to tissue Transglutaminase as predictors of celiac disease. Gastroenterol., 1998, 115:1317-1321.
6. Dieterich, W. Et al., Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nature Med., 1997, 3:797-801.

Ed. 09/2018 **DCM109-9**

Dia.Metra S.r.l.
Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

CE

DiaMetra
care for quality

DCM109-9
Ed. 09/2018

Anti Tissue Transglutaminase IgG

for routine analysis

Quantitative determination of IgG class antibodies against tissue transglutaminase in human serum or plasma

IVD

LOT
See external label

2°C 8°C

Σ = 96 tests

REF DKO109

INTENDED USE
Anti Tissue Transglutaminase IgG is an indirect solid phase enzyme immunometric assay (ELISA) kit designed for the quantitative measurement of IgG class antibodies directed against tissue transglutaminase in human serum or plasma. The assay is intended for in vitro diagnostic use only as an aid in the diagnosis of celiac disease and dermatitis herpetiformis.
Anti Tissue Transglutaminase IgG kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Celiac disease is characterized by chronic inflammation of the intestinal mucosa and flattening of the epithelium (positive villous atrophy). The origin of the celiac disease is the intolerance to gluten, the protein of wheat, rye and barley. The main symptoms are diarrhea, gastrointestinal problems, anemia, fatigue, psychiatric problems and other diverse side effects. In some cases patients may be asymptomatic.
Clinical and mucosal recovery after institution of a gluten free diet is objective evidence that the enteropathy is gluten induced.
Diagnosis of celiac disease is confirmed by abnormal findings on the small bowel biopsy and later verified by the clinical response to a gluten-free diet, i.e. the avoidance of wheat, barley, rye, oats and triticale.
Left untreated patients suffering from celiac disease have an increased risk of lymphoma or gastrointestinal neoplasm. Furthermore, even if clinically silent, longstanding untreated celiac disease predisposes for other autoimmune diseases, like Diabetes mellitus, rheumatoid diseases, autoimmune hepatitis or thyroiditis.
The European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) draw the guidelines for the celiac disease diagnosis, including: a) an initial positive gut biopsy, b) 6 months on a gluten-free diet, c) a negative second gut biopsy, d) a gluten challenge for 6 months e) a positive third gut biopsy.
Recently, the development of serum tests for three different antibodies of the IgA isotype made it possible to modify these guidelines for celiac disease. These revised ESPGAN criteria include: a) a single positive gut biopsy and b) the demonstration of at least two of the three IgA class antibodies against gliadin, endomysium or transglutaminase.
The enzyme tissue Transglutaminase (tTG) has been reported to be the main, if not sole, target for endomysial antibodies. These antibodies fall once a gluten-free diet has begun, thus facilitating monitoring of dietary compliance. Anti-tTG IgG are a highly sensitive marker for celiac disease with 95-100%, and have a specificity of 90 to 97%.
SInce two years the human tTG antigen has been produced by recombinant technology. This new antigen allows certain advantages compared with the traditional guinea pig liver antigen.
There is a percentage of patients that don't produce any IgA and probably they represent the single largest contributor to a false negative serological result in biopsy confirmed celiac patients. To correctly evaluate this group of patients, many laboratories perform IgG determinations of several samples tested for the presence of antibodies against celiac disease. Most IgA deficient celiac patients are found to be positive for IgG class, reticulin and gliadin.
Several studies on the use of IgG against t-TG to find patients not producing IgA demonstrated that test sensitivity was increased from 91.5% for IgA antibody alone to 98.5% when both IgA and IgG results were considered.

2. PRINCIPLE

Anti Tissue Transglutaminase IgG test is based on the binding of serum or plasma antibodies on the human recombinant tissue transglutaminase coated into the microplates. The antibodies in calibrators, controls or prediluted patient samples bind into the inner surface of the wells. After a 30 minutes incubation the microplate is washed with wash buffer for removing non-reactive serum components.
An anti-human-IgG horseradish peroxidase conjugate solution recognize IgG class antibodies bound to the immobilized antigens. After a 30 minutes incubation any excess enzyme conjugate, which is not specifically bound is washed away with wash buffer.
A chromogenic substrate solution containing TMB is dispensed into the wells. After 15 minutes of incubation the color development is stopped by adding the stop solution. The solutions color change into yellow. The amount of color is directly proportional to the concentration of IgG antibodies present in the original sample.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1.2 mL each)
Phosphate buffer 0.1M, NaN_3 < 0.1%, human serum

CAL0	**REF DCE002/10906-0**
CAL1	**REF DCE002/10907-0**
CAL2	**REF DCE002/10908-0**
CAL3	**REF DCE002/10909-0**
CAL4	**REF DCE002/10910-0**
CAL5	**REF DCE002/10911-0**

2. Controls (2 vials, 1.2 mL each)
Phosphate buffer 0.1M, NaN_3 < 0.1%, human serum

Negative Control	**REF DCE045/10901-0**
Positive Control	**REF DCE045/10902-0**

3. Sample Diluent (1 vial, 100 mL)
Phosphate buffer 0.1 M, NaN_3 < 0.1%
REF DCE053-0

4. Conjugate (1 vial, 15 mL)
Anti h-IgG conjugated with peroxidase, BSA 0.1%, Proclin < 0.0015% **REF DCE002/10902-0**

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)
Microplate coated with human recombinant tissue transglutaminase **REF DCE002/10903-0**

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
H_2O_2-TMB 0.26 g/L *(avoid any skin contact)*
REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15M *(avoid any skin contact)*
REF DCE005-0

8. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)
Phosphate buffer 0.2M pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.
Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Notes

Store all reagents between 2÷8°C in the dark.
Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, Calibrators and Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN_3) or Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H_2O_2 to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.
  For this purpose, Dia.Metra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop

Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemeic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrator (C_0…C_5)

Since no international reference preparation for Anti-tissue transglutamise antibodies is available, the assay system is calibrated in relative arbitrary units. The Calibrators are ready to use and have the following concentration:

	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
AU/mL	0	5	20	40	80	320

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of the Sample

Either human serum or plasma samples can be used for the test. **All serum and plasma samples have to be diluted 1:100 with sample diluent**; for example 10 L of sample may be diluted to 1,000 L with sample diluent.
Test samples should be clear. Contamination by lipemia is best avoided, but does not interfere with this assay.
Specimens may be refrigerated at 2-8°C for up to five days or stored at -20°C up to six months. Avoid repetitive freezing and thawing of samples. This may result in variable loss of autoantibody activity
Testing of heat-inactivated sample is not recommended.

6.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (10x) with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.
In the concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals; for greater accuracy dilute the whole content of the bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care also to transfer crystals completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C_0-C_5), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Calibrator C_0-C_5	**100 µL**		
Controls		**100 µL**	
Diluited Sample		**100 µL**	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. **Important note**: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. **Automatic washer**: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
Conjugate	**100 µL**	**100 µL**	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. **Washing**: follow the same indications of the previous point.			
TMB Substrate	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
Stop Solution	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

- The Positive and Negative Control should be run with every batch of samples to ensure that all reagents and procedures perform properly.
- Because Positive and Negative Control are prediluted, they do not control for procedural methods associated with dilution of specimens.
- Additional suitable control sera may be prepared by aliquoting pooled human serum specimens and storing at < -20°C.
- In order for the test results to be considered valid, all of the criteria listed below must be met. If any of these are not met, the test should be considered invalid and the assay repeated:
  - The absorbance of the prediluted h-tTG IgG Positive must be greater than the absorbance of the prediluted Negative Control.
  - The Negative and Positive Control are intended to monitor for substantial reagent failure and they will not ensure precision at the assay cut-off.
  - This test is only valid if the optical density at 450 nm for Positive Control and Negative Control as well as for the Calibrator C_0-C_5 complies with the respective range indicated on the Quality Control Certificate enclosed to each test kit: If any of these criteria is not met, the results are invalid and the test should be repeated.

8. RESULTS

For the test Anti Tissue Transglutaminase IgG a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice. Smoothed-Spline Approximation and log-log coordinates are also suitable. However we recommend using a Lin-Log curve.
First calculate the averaged optical densities for each calibrator well. Use lin-log graph paper and plot the averaged optical density of each calibrator versus the concentration. Draw the best fitting curve approximating the path of all calibrator points. The calibrator points may also be connected with straight line segments. The concentration of unknowns may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with the Anti-tTG IgG tests:

Anti Tissue Transglutaminase IgG (AU/mL)	
Cut-Off	20

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacurer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.
Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually. It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of seric Anti-tTG.

9. LIMITATIONS OF PROCEDURE

- The presence of immune complexes or other immunoglobulin aggregates in the patient sample may cause an increased level of non-specific binding and produce false positives in this assay.
- A negative h-tTG IgG result in an untreated patient does not rule out gluten-sensitive enteropathy. The patient may be IgA positive or have no antibody to tTG.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision and reproducibility

Precision and reproducibility are evaluated by eight reply of two positive samples by two different runs with two different lots.
Dispensing and washing operations were performed manually by an operator.
The results in terms of Calibrator deviation and coefficient of variation were below:

Sample	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-test	12.49	7.1	7.85	6.7
Inter-test	0.36	3.8	12.37	7.5

11.1. Specificity

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 32 sera (18 positive sera and 14 negative sera) showed a 90.9% specificity.

11.2. Sensitivity

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 32 sera (18 of them positive sera and 14 negative sera) showed a 81.0% sensitivity.

11.3. Detection Limit

The lowest concentration of anti-tTG IgG that can be distinguished from Calibrator 0 is 0.12 AU/mL with a confidence limit of 95%.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Williams, C.N. Celiac disease: Past, present and future. Can. J. Gastroenterol., 1997, 11:647-649.
2. Sollid, L.M. Coeliac diasease: Dissecting a complex inflammatory disorder. Nature Rev., 2002, 2:647-655.
3. Fesus, L., And M. Piacentini. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Trends Biochem. Sci., 2002, 27:534-539.
4. Dieterich, W. Et al. Serum antibodies in Celiac Disease. Clin. Lab., 2000, 46:361-364.
5. Dieterich, W. Et al. Autoantibodies to tissue Transglutaminase as predictors of celiac disease. Gastroenterol., 1998, 115:1317-1321.
6. Dieterich, W. Et al., Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nature Med., 1997, 3:797-801.

Ed. 09/2018 **DCM109-9**

Dia.Metra S.r.l.
Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

CE

DiaMetra
care for quality

DCM109-9
Ed. 09/2018

Anti Tissue Transglutaminase IgG

para análisis diagnóstico

Prueba inmunoenzimatica para la determinación cuantitativa de los anticuerpos clase IgG contra la transglutaminas tisular en suero o plasma humano.

IVD | **LOT** Ver etiqueta externa | 2°C 8°C | Σ = 96 test | **REF DKO109**

USO PREVISTO
El kit Anti Tissue Transglutaminase IgG utiliza una metodología inmuno enzimática colorimétrica (ELISA) directa para la determinación de los anticuerpos clase IgG contra la transglutaminasa tisular en suero o plasma humano. El test es para uso exclusivo de diagnostico en vitro como apoyo en la diagnosis de la enfermedad celiaca y en la dermatitis herpetiforme.
El kit Anti Tissue Transglutaminase IgG está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLINICA

La malattia celiaca è caratterizzata da infiammazione La enfermedad celíaca se caracteriza por la inflamación crónica de la mucosa intestinalcon con aplanamiento del epitelio (atrofia de las vellosidades, positivo). La causa de la enfermedad celíaca es la intolerancia al gluten, una proteína que se encuentra en el trigo, el centeno y la cebada. Los síntomas más evidentes son la diarrea, problemas gastrointestinales, anemia, fatiga, problemas mentales, algunos pacientes pueden ser asintomáticos (1). La remisión clínica y la normalización de la mucosa después de una dieta libre de gluten representan un hecho objetivo de que la enteropatía es inducida por el gluten. [2]. El diagnóstico de la enfermedad celíaca es confirmado por los hallazgos anormales en las biopsias intestinales y, posteriormente, verificados por la respuesta clínica a una dieta libre de gluten, por ejemplo, evitar el trigo, el centeno, la avena y el triticale. Si no se tratan, los pacientes con enfermedad celíaca muestran un mayor riesgo de linfoma y tumores gastrointestinales. Ademas aun si asintomática, la enfermedad celíaca si no es tratada facilita el aparecimiento de otras enfermedades autoinmunes como la diabetis mellitus, enfermedades reumáticas, hepatitis y tiroiditis autoinmunes. La Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (ESPGAN) ha elaborado directrices para el diagnóstico de la enfermedad celíaca, que incluyen: a) una biopsia intestinal positiva, b) 6 meses de dieta libre de gluten, c) una segunda biopsia intestinal negativa, d) un reto con gluten durante 6 meses, e) tercera biopsia intestinal positiva.
Recientemente, el desarrollo de las pruebas serológicas ha hecho posible cambiar estas directrices con el fin de llegar a un diagnóstico más rápido. Estos nuevos criterios son: una sola biopsia intestinal y la demostración positiva de la presencia de al menos dos anticuerpos IgA a la gliadina, endomisio y/o a la Transglutaminasa. La enzima transglutaminasa tisular (tTG) fue identificada como el principal, si no el único blanco de los anticuerpos antiendomisio. Estos anticuerpos bajan una vez que comenzó una dieta libre de gluten, lo cual permite vigilar el cumplimiento de la dieta. Los anticuerpos anti-tTG IgG son otro marcador extremadamente sensible (95-100%) con una especificidad del 90-97%. [3, 4, 5, 6]. Desde hace unos años el antígeno tTG ha sido producido por tecnología recombinante. Este nuevo antígeno permite ciertas ventajas en comparación con el antígeno convencional derivado del hígado de conejillo de indias. Hay un porcentaje de pacientes que no producen ningún tipo IgA y que representan la mayor fuente de falsos negativo con enfermedad celiaca confirmada por biopsia. Para evaluar correctamente este grupo de pacientes, muchos laboratorios realizan determinaciones de IgG para detectar la presencia de anticuerpos contra la enfermedad celíaca. Varios estudios sobre el uso de IgG frente a t-TG para encontrar pacientes que no producen IgA han demostrado que la sensibilidad de la prueba se incrementa desde 91,5% (cuando los estudios incluyen solamente la determinación de los Ac anti-tTG IgA) hasta el 98,5% cuando se miden ambos anticuerpos anti-tTG IgA e IgG.

2. PRINCIPIO DEL METODO

El test Anti Tissue Transglutaminase IgG se basa sobre la unión de los anticuerpos presentes en la muestra con la trasglutaminasa tisular humana recombinante unida al pozo. Los anticuerpos presentes en las muestras, controles y Calibradores se unen al antígeno ligado al pozo, después de 30 minutos de incubación el pozo se lava con una solución de lavado para eliminar los componentes que no han reaccionado. Una solución de inmunoglobulinas anti IgG humana conjugadas con peroxidasa se agrega al pozo y se une a las IgG que han reaccionados, el exceso se elimina lavando el pozo con la solución de lavado. Se agrega una solución de substrato cromogenica (TMB) y después de 15 minutos se para la reacción agregando solución de parada. La intensidad de color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de los anticuerpos presentes en la muestra.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACION

3.1. Reactivos y Materiales Provistos en el Kit

1. Calibradores (6 viales, 1,2 mL cada uno)
Tampón fosfato 0,1M, NaN_3< 0,1%, suero humano

CAL0	**REF DCE002/10906-0**
CAL1	**REF DCE002/10907-0**
CAL2	**REF DCE002/10908-0**
CAL3	**REF DCE002/10909-0**
CAL4	**REF DCE002/10910-0**
CAL5	**REF DCE002/10911-0**

2. Controles (2 viales, 1,2 mL cada uno)
Tampón fosfato 0,1M, NaN_3< 0,1%, suero humano

Control Negativo	**REF DCE045/10901-0**
Control Positivo	**REF DCE045/10902-0**

3. Diluyente de muestra (1 vial, 100 mL)
Tampón fosfato 0,1M, NaN_3< 0,1%
REF DCE053-0

4. Conjugado (1 vial, 15 mL)
Anti h-IgG coniugado con peroxidasa, BSA 0,1%, Proclin < 0,0015% **REF DCE002/10902-0**

5. Microplaca (1 microplaca fraccionable)
marcada con transglutaminasa tisular recombinante humana) **REF DCE002/10903-0**

6. TMB Substrato (1 vial, 15 mL)
H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) *(evítese el contacto con la piel)*
REF DCE004-0

7. Solución de parada (1 vial, 15 mL)
Acido sulfurico 0,15M *(evítese el contacto con la piel)*
REF DCE005-0

8. Solución de lavado 10X (1 vial, 50 mL)
Tampón fosfato 0,2M pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada.

3.3. Materiales requeridos

Dispensadores automáticos.
Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8 ºC.

Atemperar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradores y de los controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los controles positivo y negativo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN_3) o Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H_2O_2 a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- **ATENCIÓN**: **se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa adecuadamente, podría contaminarse por agentes externos**; se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad necesaria exacta de conjugando y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática**, se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la fluídica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteinización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso. Para tal fin, Dia.Metra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.

- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el substrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C_0…C_5)

Debido a que no son disponibles Calibradores internacionales de referencia para los anticuerpos anti-tTG, el sistema es calibrado en unidades arbitrarias UA/mL.
Los Calibradores son listos para usar y tienen las siguientes concentraciones:

	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
AU/mL	0	5	20	40	80	320

Una vez abiertos, los Calibratores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8°C.

6.2. Preparazione del campione

Las matrices preferidas para la determinación de los anticuerpos anti tTG IgG son suero o plasma humano. **Todas las muestras de suero o plasma deben prediluirse 1:100 con diluyente de muestras**; por ejemplo, 10 µL de muestra pueden diluirse con 990 µL de diluyente de muestras.
Las muestras que se van a usar deben estar limpias. Se recomienda evitar la contaminación por hiperlipemia, aunque esta no interfiera con el análisis. Las muestras pueden conservarse refrigeradas a 2-8°C durante al menos 5 días. Para períodos de conservación más largos, hasta 6 meses, las muestras deberán congelarse a -20°C. Se aconseja evitar congelar y descongelar las muestras repetidas veces, esto puede llevar a una pérdida de actividad de los anticuerpos. No se recomienda análisis de muestras inactivadas por calor.

6.3. Preparación de la Solución de Lavado

Antes de su uso diluya el contenido de cada vial de solución de lavado concentrada (10X) con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Si quiere preparar cantidades menores agregue una parte de solución de lavado concentrada mas nueve partes de agua destilada.
La solución de lavado diluida es estable 30 días almacenada 2º-8º C.
En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C_1-C_5), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C_0-C_5	**100 µL**		
Controles		**100 µL**	
Muestra Diluida		**100 µL**	
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22°-28°C) Descartar el sobrenandante y lavar los pozos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida. **Nota importante**: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. **Lavados automático**: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Conjugado	**100 µL**	**100 µL**	
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22°-28°C) Descartar el sobrenandante y lavar los pozos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida. **Lavados**: siga las mismas instrucciones del punto anterior			
TMB Substrato	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente al resguardo de la luz (22-28°C).			
Solución de Parada	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Mezcle suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

- Incluya el control (negativo y positivo) en cada corrida, esto para asegurar que todos los reactivos funcionen correctamente.
- Los controles son pre diluidos, por lo tanto no representan un control de procedimiento para las técnicas de dilución utilizadas para las muestras.
- Ulteriores sueros controles pueden prepararse utilizando un pool de sueros humanos.
- Para validar el ensayo, los siguientes criterios deberían ser satisfechos:
  - La absorbancia del control positivo debe ser mayor a la del control negativo.
  - El control negativo y Positivo sirven únicamente para determinar el buen funcionamiento del kit.
  - Il test es válido única y exclusivamente si la densidad óptica a 450 nm del Control Positivo como la de los Calibradores se encuentra adentro de los intervalos indicados en el Certificado de Control de Calidad incluido en el kit.

8. RESULTADOS

El método preferido para el tratamiento de los datos obtenidos es calcular el promedio de las densidades ópticas de los Calibradores y plotear en papel Lin-Log la absorbancia de cada Calibración versus la concentración. Dibujar la curva e interpolar la absorbancia de la muestra para calcular la concentración.
En un estudio realizado en sujetos normales para asignar valores de referencia se obtuvo el siguiente intervalo normal para el ensayo Anti tissue transglutaminase IgG:

Anti Tissue Transglutaminase IgG (AU/mL)	
Cut-Off	20

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.
El valor reportado es sugerido. Cada Laboratorio debería establecer su propio rango de valor normal basado en su procedimiento, controles, equipamiento y la población. Los resultados positivos deben ser comparados con el estado clínico del paciente. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos normales.

9. LIMITACIONES DEL TEST

- La presencia en la muestra de complejos inmunes u otros agregados de inmunoglobulinas podría determinar reacciones inespecíficas con consiguientes resultados falsos positivos
- Un resultado negativo para IgG anti-h-tTG en un paciente sin tratamiento no excluye una enteropatia sensibile al gluten. El subjeto podría ser positivo al test de IgA o bien podría no presentar anticuerpos IgG anti-tTG.

10. PRESTACIONES CARACTERISTICAS

10.1. Precisión y reproducibilidad

La precision y reproducibilidad han sido evaluadas testando ocho replicados de dos muestras positivas en dos experimentos distintos con dos kits de lotes diferentes. Las operaciones de dispensado y lavado han sido realizada de forma manual. Los resultados obtenidos en terminos de desviación estandar y coeficiente de variación se reporta en la tabla siguiente:

Muestra	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-test	12.49	7.1	7.85	6.7
Inter-test	0.36	3.8	12.37	7.5

10.2. Specificità

Un test de correlación, contra un kit comercial análogo, efectuado sobre 40 muestras (18 positivos y 14 negativos) demostró una especificidad del 100.0%.

10.3. Sensibilità

Un test de correlación, contra un kit comercial análogo, efectuado sobre 40 muestras (18 positivos y 14 negativos) demostró una sensibilidad del 81,0%.

10.4. Concentración mínima medible

La menor concentración de anti-tTG IgG que puede distinguirse del Calibrador 0 es 0.12 AU/mL con un limite de confianza del 95%.

11. MANEJO DE LOS PRODUCTOS RESIDUALES

Los reactivos deben ser desechados según las leyes locales.

BIBLIOGRAFIA

1. Williams, C.N. Celiac disease: Past, present and future. Can. J. Gastroenterol., 1997, 11:647-649.
2. Sollid, L.M. Coeliac diasease: Dissecting a complex inflammatory disorder. Nature Rev., 2002, 2:647-655.
3. Fesus, L., And M. Piacentini. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Trends Biochem. Sci., 2002, 27:534-539.
4. Dieterich, W. Et al. Serum antibodies in Celiac Disease. Clin. Lab., 2000, 46:361-364.
5. Dieterich, W. Et al. Autoantibodies to tissue Transglutaminase as predictors of celiac disease. Gastroenterol., 1998, 115:1317-1321.
6. Dieterich, W. Et al., Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nature Med., 1997, 3:797-801.

Ed. 09/2018 **DCM109-9**

Dia.Metra S.r.l.
Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1

IVD	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção,consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 Σ = xx	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
Max  Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitaciôn de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Nûmero de catálogo Référéncès du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers

insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run

- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)

too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)

- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del substrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs