



Garbiarska 2, 040 01 KOŠICE



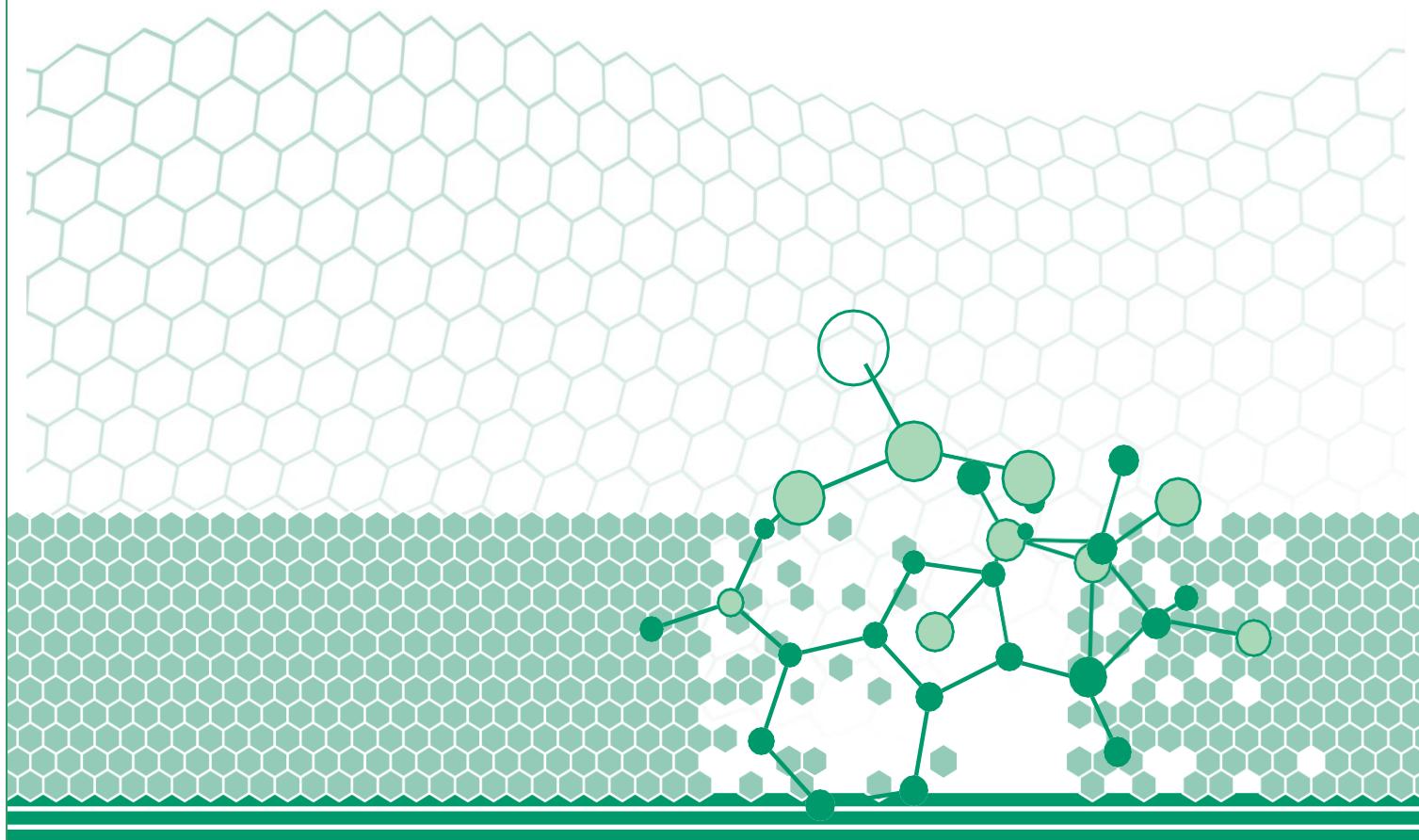
Návod na použitie

# ELISA-anti-GLIADÍN natívny-II-A

REF E-233

$\Sigma$   
96

IVD



Súprava ELISA-anti-GLIADÍN natívny-II-A je určená na kvantitatívne stanovenie špecifických protilátok proti gliadínu triedy IgA v ľudskom sére. Umožňuje stanovenie 40 neznámych vzoriek v duplikátoch.

Stanovenie anti-gliadínových protilátok v ľudskom sére sa využíva na zlepšenie diagnostických možností a na monitorovanie liečby celiakie. Celiakia je geneticky podmienené autoimunitné ochorenie detí a dospelých. V európskej populácii sa udáva prevalencia celiakie 1:100 až 1:300. Príčinou choroby je intolerancia bielkovín pšenice, jačmeňa, raže a ovsa. Intolerancia je na bielkoviny endospermu obilných zŕn, tzv. glutén (lepk), z ktorého sa dá etanolom extrahovať gliadin, frakcia obsahujúca asi 50 proteínových zložiek. V dôsledku ochorenia vzniká v sliznici tenkého čreva celý rad zmien od zvýšeného množstva interepitelálnych lymfocytov až po hyperpláziu krýpt a oploštenie klkov. Klinické príznaky celiakie sú veľmi variabilné a rozdielne u detí a dospelých. K typickým príznakom patria hnačky, chudnutie, bolesti brucha, únavu. K atypickým formám býva zaradená dermatitis herpetiformis Duhring. Ochorenie sa môže prejavíť bolestami kostí, stagnáciou rastu, oneskorenou pubertou, infertilítou, opakoványmi potratmi, anémiou, osteoporózou, atď. Obávanými komplikáciami celiakie sú gastrointestinálne karcinómy a lymfómy. Liečba spočíva v dodržiavaní diéty s prísnym vylúčením gluténu zo stravy pacienta.

## PRINCÍP

Stanovenie je založené na princípe nepriamej ELISA metódy na detekciu špecifických protilátok. Antigén je imobilizovaný na povrchu jamiek mikrotitračnej doštičky. Testované vzorky nariedeného ľudského séra sa inkubujú v jamkách mikrotitračnej doštičky. V tejto fáze dochádza k naviazaniu špecifických protilátok z ľudského séra na imobilizovaný antigén. Po inkubácii sa premytím odstránia nezreagované komponenty ľudského séra a pridá sa konjugát chrenovej peroxidázy s protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu IgA. Po inkubácii a odstránení prebytočného konjugátu sa pridá substrát TMB a enzymová reakcia sa zastaví pridaním kyseliny sírovej. Absorbancia testovaných vzoriek sa porovnáva s absorbanciou štandardov. Intenzita sfarbenia je úmerná množstvu špecifických protilátok prítomných v sére.

## ZLOŽENIE

### Nezamieňať substancie z iných súprav!

#### 1. Mikrotitračná doštička

12 ks 8-jamkových lámateľných stripov aktivovaných antigénom.

#### 2. Štandardy

6 fläštičiek, (6 x 1 ml) s roztokmi špecifickej protilátky proti gliadínu triedy IgA. Koncentrácia štandardov 0 – 5 – 10 – 20 – 40 – 80 U.ml<sup>-1</sup>. Štandardy sú vyriedené v zriedovacom roztku, pripravené na použitie.

#### 3. Kontrolné vzorky

2 fläštičky, 1 fläštička (1 ml) s kontrolou vzorkou negatívou a 1 fläštička (1 ml) s kontrolou vzorkou pozitívou, sú vyriedené v zriedovacom roztku, pripravené na použitie. Koncentrácie kontrolných vzoriek sú uvedené v Osvedčení o súprave.

#### 4. Substrát TMB

1 fläštička (8 ml) s TMB (3,3',5,5' - tetrametylbenzidín). Je pripravený na použitie.

#### 5. Zriedovací roztok

1 fläštička (100 ml) s TRIS-HCl tlmivým roztokom s obsahom bovinného sérového albumínu, 0,2% azidu sodného, 0,02% timerosalu a modrého farbiva, pH 7,0 ± 0,2. Je pripravený na použitie.

## 6. Vymývací roztok

1 fläštička (50 ml). Obsah fläštičky s vymývacím roztokom doplňte do 1000 ml destilovanou vodou.

## 7. Konjugáty

1 fläštička (12 ml) s konjugátom HRP-anti-IgA. Je pripravený na použitie.

## 8. Kyselina sírová

1 fläštička (8 ml) s roztkom 0,5 mol.l<sup>-1</sup> kyseliny sírovej. Je pripravený na použitie.

## PRÍPRAVA VZRIEK

Súprava je určená na stanovenie vzoriek krvného séra. Čerstvé vzorky sa v priebehu stanovenia uskladňujú do 72 hodín pri 2-8 °C. Vzorky séra sa dlhodobo uskladňujú pri -20°C. Tieto po rozmrzení viackrát nezamrazujte. Na stanovenie nepoužívajte lipemické, hemolyzované alebo kontaminované krvné séra. Pacientske séra sa riedia 1:101, t.j. 10 µl séra sa zriedi prídatkom 1 ml zriedovacieho roztku.

## DOPORUČENIE PRE PRÁCU SO SÚPRAVOU

- Všetky reagencie musia byť pred začiatkom stanovenia vytemperované na laboratórnu teplotu.
- Všetky inkubácie sa robia pri laboratórnej teplote 18 - 25°C.
- Odporúčame, aby sa štandardy, negatívna, pozitívna vzorka a pacientske séra spracovali v duplikátoch.
- Pracujte s presnými pipetami.
- Zabráňte mechanickému poškodeniu stripov.
- Nepoužité stripы uchovávajte v obale spolu s vysušovadlom.
- Po ukončení premývania je dôležité dôkladne odstrániť vymývací roztok zo stripov.

## PRACOVNÝ POSTUP

### 1. Pipetujte do jamiek stripov:

- po 100 µl štandardov
  - po 100 µl negatívnej kontrolnej vzorky
  - po 100 µl pozitívnej kontrolnej vzorky
  - po 100 µl pacientských zriedených vzoriek
- ### 2. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote.

- Po ukončení inkubácie strip 4x premyte vymývacím roztokom, pripraveným podľa návodu.

Poznámka: Pokiaľ nie je k dispozícii špeciálna premývačka pre mikrotitračné doštičky, premývanie spočíva v napipetovaní cca 250 µl vymývacieho roztoku do všetkých použitých jamiek. Po 30 sekundách sa vymývací roztok zo stripov prudko vyleje. Postup sa opakuje ešte 3x.

- Po ukončení premývania mikrotitračnú doštičku otočte hore dnom a okraje osušte filtračným papierom.
- Do jamiek napipetujte po 100 µl konjugátu HRP-anti-IgA a inkubujte pri laboratórnej teplote 30 minút.
- Stripy znova 4x premyte vymývacím roztokom a osušte podľa bodu 4.
- Do jamiek napipetujte bez prerušenia po 50 µl substrátu TMB. Pipetovanie musí byť ukončené do 2 minút!
- Vyfarbuje sa 15 min v tme.
- Reakcia sa zastaví pridaním 50 µl kyseliny sírovej do každej jamky.
- Intenzitu sfarbenia merajte na fotometrickom čítači mikrotitračných doštičiek pri vlnovej dĺžke 450 nm. Ako referenčný filter môže byť použitý filter s vlnovou dĺžkou od 600 – 690 nm. Meranie ukončite najneskôr do 1 hod po skončení vyvýjania. Doštičku medzitým uschovajte v tme.

## INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

- Ked' nie je k dispozícii program na zstrojenie kalibračnej závislosti, použite nasledovný postup.
- Vypočítajte priemerné absorbancie pre každý štandard, kontrolné a pacientske vzorky.
- Nakreslite štandardnú krivku na semilogaritmický papier vynesením logaritmu koncentrácií štandardov ( $\text{U.ml}^{-1}$ ) na horizontálnu (x) os proti priemerným absorbanciam štandardov na vertikálnu (y) os.
- Z krivky odčítajte hodnotu koncentrácií kontrolných a pacientskych vzoriek. Táto hodnota sa už nenásobí riediacim faktorom.

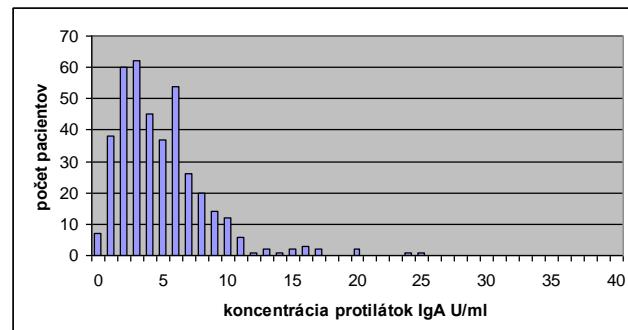
## OČAKÁVANÉ HODNOTY

Očakávané hodnoty u zdravej populácie sú negatívne. Avšak, aj u asymptomatických, zjavne zdravých osôb môžu byť zvýšené hladiny protilátok proti gliadínu.

Odporučame nasledovné hodnotenie pre protilátky triedy IgA:

Negatívne hodnoty  $< 11 \text{ U.ml}^{-1}$   
Hraničná hodnota  $11 - 14 \text{ U.ml}^{-1}$   
Pozitívne hodnoty  $> 14 \text{ U.ml}^{-1}$

Hodnoty boli získané spracovaním 400 sér zdravých jedincov. Tieto hodnoty by mali byť považované len za orientačné. Každé laboratórium by si malo stanoviť vlastné rozpätie normálnych hodnôt na základe klinicky charakterizovaných vzoriek.



## KONTROLA KVALITY STANOVENIA

- Absorbancia nulového štandardu by mala byť menej ako 0,2.
- Absorbancia najvyššieho štandardu by mala byť viac ako 0,8.
- Hodnoty koncentrácií negatívnej a pozitívnej kontrolnej vzorky sa musia pohybovať v intervale koncentrácií uvedenom v Osvedčení o súprave.

## CHARAKTERISTIKA STANOVENIA

### Štandardizácia

Štandardy v súprave ELISA-anti-GLIADÍN natívny-II-A sú kalibrované proti internému referenčnému štandardu.

### Merací rozsah

5-80  $\text{U.ml}^{-1}$ .

### Citlivosť

Detekčný limit súpravy je 4  $\text{U.ml}^{-1}$ .

### Špecificita

Súpravou stanovujeme protilátky triedy IgA proti antigénom gliadiunu.

### Opakovateľnosť

INTRA-ASSAY	A	B	C
Počet stanovení	16	16	16
Priemer $\text{U.ml}^{-1}$	3,08	27,20	58,68
SD $\text{U.ml}^{-1}$	0,22	1,23	2,65
C.V. %	7,14	4,52	4,52

### Reprodukčnosť

INTER-ASSAY	A	B	C
Počet stanovení	17	17	23
Priemer $\text{U.ml}^{-1}$	3,64	27,61	57,00
SD $\text{U.ml}^{-1}$	0,52	2,32	3,85
C.V. %	14,29	8,40	6,75

### Recovery

Metódou štandardného prídatku sa získajú hodnoty 80 - 120%.

## UPOZORNENIE

- Súprava je určená pre profesionálne in vitro použitie v laboratóriu.
- V prípade výskytu nežiaducích príhod, tieto hláste na č. tel. +421 55 6228 131, biogema4@biogema.sk
- Jednotlivé substancie súpravy obsahujú konzervačné činidlá azid sodný a timerosal. Azid sodný reaguje s olovom a meďou za vzniku výbušných azidov. Azid sodný a timerosal môžu pri priamom kontakte s pokožkou spôsobiť podráždenie. V prípade kontaktu s pokožkou postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.
- Kyselina sírová, v koncentrácií 0,5 mol.l<sup>-1</sup>, môže pri priamom kontakte s očami alebo pokožkou spôsobiť podráždenie. V prípade zasiahnutia očí alebo kože postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.
- Azid sodný, timerosal a kyselina sírová v koncentráciách, ktoré sú použité v súprave, sú zdraviu škodlivé. Vzhľadom k nízkemu obsahu škodlivých látok v substanciach súpravy životné prostredie nie je ohrozené.
- Kontrolné vzorky a štandardy obsahujú ľudské sérum. Ľudské sérum použité na prípravu kontrolných vzoriek a štandardov vykazovalo negatívnu reakciu na prítomnosť antigénu HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV. Žiadna metóda stanovenia však nie je schopná dať stopercentnú istotu, preto so substanciami obsahujúcimi ľudské sérum pracujte ako s infekčným materiálom, pri práci používajte rukavice.
- Výrobca ručí za výsledky dosiahnuté ELISA-anti-GLIADÍN natívny-II-A len v prípade dodržiavania návodu a skladovacích podmienok. Reagencie nepoužívajte po uplynutí exspiračnej doby.

## LIKVIDÁCIA ODPADU

Nepoužité zvyšky pacientskych vzoriek a substancie obsahujúce ľudské sérum likvidujte ako infekčný materiál, ostatný materiál a nepoužité zvyšky súpravy obsahujúce nebezpečné chemické látky odporúčame tiež zabezpečiť v súlade s ustanoveniami zákona NR SR č. 223/2001 Z.z. a vyhlášky MŽP SR č. 284/2001 Z.z.

## SKLADOVANIE A STABILITA

Súpravu skladujte pri 2 - 8 °C. Doba exspirácie súpravy je 6 mesiacov odo dňa výroby, ak sú substancie v pôvodnom stave. Neodporúčame kombinovať substancie viacerých šarží.

## LITERATÚRA:

Bejdová,T., Stecová,A.: Celiakia–morfológia, patogenéza a diagnostika. Laboratórna diagnostika, 2003, (2-3), 22-25

Carlsson,A.K., Axelsson,I.E.M., Borulf,S.K., Bredberg,A.C.A., Ivarsson,S.A.: Serological screening for celiac disease in healthy 2,5-year-old children in Sweden. Pediatrics, 2001, 197 (1), 42-45

Hvatum,M., Scott,H., Brandtzaeg,P.: Serum IgG subclass antibodies to a variety of food antigens inpatients with coeliac disease. Gut, 1992, 33, (5), 632–638

Krajčírová,M., Čierna,I., Zaviačič,M., Tibenská,E.: Celiakálna choroba detí–10 ročné sledovanie. Čes. a Slov. Gastroent., 1999, 53, (3), 75-79

Maki,M., Collin,P.: Coeliac disease. Lancet, 1997, 349, 1755-1759

Páv,I.: Celiakia v ambulantnej praxi. Via pract., 2006, 3(1), 22-24

Vančíková,Z., Chlumecký,V., Sokol,D., Horáková,D., Hamšíková,E., Fučíková,T., Janatková,I., Ulčová-Gallová,Z., Štěpán,J., Límanová,Z., Dvořák,M., Kocna,P., Sánchez,D., Tučková,L., Tlaskalová-Hogenová,H.: The serologic screening for celiac disease in the general population ( blood donors) and in some high – risk groups of adults (patients with autoimmune diseases, osteoporosis and infertility) in Czech Republic. Folia Microbiologica 2002, 47 (6), 753 - 758

	EN ISO 9001 v platnom znení	Certifikovaný systém manažérstva kvality		Pozri návod na používanie		Podniková norma
	EN ISO 13485 v platnom znení	Certifikovaný systém manažérstva kvality pre zdravotnícke pomôcky		Nepoužívať opakovane		Použiteľné do
		Značka zhody so Smernicou Európskeho parlamentu a Rady 98/79/ES a NV SR č. 569/2001 Z.z.		Diagnostická zdravotnícka pomôcka <i>in vitro</i>		Jednorazový obal po použití vyhodiť do príslušnej zbernej nádoby
		Obmedzenie teploty		Výrobca		Zelený bod
		Dátum výroby		Kód dávky		Recyklateľný obal
		Chrániť pred slnkom		Obsah postačuje na n skúšok		Varovanie
		Positívna kontrola		Negatívna kontrola		Štandardy
		Konjugát HRP		Substrát TMB		Kyselina sírová
		Vymývací roztok		Zriedovací roztok		Mikrotitračná doštička potiahnutá antigénom



BIOGEMA, výrobné družstvo, Košice

Garbiarska 2, 040 01 Košice, SR

Tel.: +421 55 - 633 6753, 622 5719, 622 8131

e-mail: biogema3@biogema.sk www.biogema.sk



01/2022

BIOGEMA CZ, s.r.o.

Šromova 803/1b, 643 00 Brno

Tel.: +420 545 578 255, mobil +420 603 973 047

e-mail: biogema@biogema.cz www.biogema.cz

Distribúcia v ČR

## Odporúčania na spracovanie súprav na ELISA automatoch.

Nastavenie teploty v automatizovanom systéme musí byť zabezpečené tak, aby bolo v súlade s odporúčanou teplotou uvedenou v návodoch pre spracovanie súprav.

Odporúčame zabezpečiť aby substrát v automate neboli vystavený svetlu a aby sa tým eliminovala možnosť jeho znehodnotenia (zmodranie na svetle). Odporúčame mať počas spracovania súpravy zatvorený hlavný kryt automatizovaného systému.

Pre každé spracovanie súpravy použiť a nariediť iba potrebné množstvo čerstvých substancií. Ak už vzniknú prebytky z predchádzajúcich meraní (napr. vymývacieho roztoku, štandardov ...) neodporúčame na ďalšie použitie aj keď boli uskladnené v chlade.

Pred samotným spracovaním v automatizovanom systéme je dôležité dodržať odporúčania ohľadne vytemperovania substancií (vplyv na presnosť merania) a mikrotitračnej platničky (eliminovať možnosť kondenzátu po vybratí z uskladnenia v chlade).

Substancie používať iba v rámci príslušnej šarže a súpravy (nesmú sa miešať substancie medzi rôznymi šaržami)

Odsledovať časový priebeh jednotlivých krokov v rámci spracovania súpravy v automatizovanom systéme či korešponduje s odporúčaným postupom uvedeným v návode (hlavne po fáze premývania by mala byť hned pridaná príslušná substancia - konjugát, substrát). V prípade nesúladu konzultovať správne programové nastavenia so servisným technikom.

Skontrolovať správny priebeh každého kroku spracovania súpravy v automatizovanom systéme – napr. nevšimnutie si, že sú zlepnené prívodné hadičky spôsobí zlé premýtie platne.